

Universität Zürich
Physiologisches Institut
Prof. Dr. phil. nat. Roland H. Wenger

Arbeit unter Leitung von Dr. med. Dr. phil. Martin Zweifel
Klinik und Poliklinik für Onkologie (Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Knuth)
Universitätsspital Zürich

**Expression von löslichem und transmembranärem
VEGF Rezeptor 1 in Brustkrebs- und Endothelzellen
unter Hypoxie und Normoxie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von
Christoph Müller
von Stein AR

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	3
2	Einführung	5
2.1	Tumorangiogenese	5
2.2	VEGF und das VEGF-Rezeptor-System	8
2.3	VEGFR-1 als natürlicher negativer Regulator der Angiogenese	9
2.4	Isoformen von VEGFR-1 durch Alternatives Splicing	11
3	Ziel dieser Dissertation	13
4	Material und Methoden	14
4.1	Versuchsanordnung und Zellkulturen	14
4.2	Zellzählung	15
4.3	RNA-Extraktion und RT-qPCR	15
4.4	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	17
4.5	Immunopräzipitation	17
4.6	Western Blot	18
4.7	Stichprobenzahl und Statistik	19
5	Resultate	20
5.1	Wachstum und Viabilität der Zellkulturen	20
5.1.1	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)	20
5.1.2	Humane Brusttumorzelllinie MCF-7	21
5.1.3	Humane Brusttumorzelllinie T47D	21
5.2	RT-qPCR zur Quantifizierung von VEGFR-1 und sVEGFR-1 mRNA	22
5.3	ELISA zum Nachweis von VEGFR-1, VEGF und PIGF	22
5.3.1	ELISA zum Nachweis von VEGFR-1 in Zelllysat und Medium	22
5.3.2	ELISA zum Nachweis von VEGF im Medium	23
5.3.3	ELISA zum Nachweis von PIGF im Medium	23
5.4	Western blots	24
5.4.1	Western blot Analyse VEGFR-1	24
5.4.2	Immunopräzipitation von löslichem VEGFR-1	24
5.4.3	Western blot zur Analyse von VEGFR-2	26
5.4.4	Western blot Analyse für Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)	26
6	Diskussion	27
7	Referenzen	34
8	Tabellen und Figuren	34
9	Western Blot Resultate	56
10	Danksagung	68
11	Curriculum vitae	69

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Der "Vascular endothelial growth factor receptor 1" (VEGFR-1) wird von Endothelzellen, Leukozyten und Tumorzellen exprimiert. Durch alternatives Splicing der prä-mRNA von VEGFR-1 entstehen zwei Isoformen, der membranständige VEGFR-1, welcher nach Bindung an seinen Liganden die pro-angiogene Wirkung von VEGFR-2 verstärken kann, und der lösliche sVEGFR-1, welcher ein endogener Angiogenese-Inhibitor ist. Es wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression von VEGFR-1 unter Hypoxie zunimmt, dabei wurde jedoch nicht zwischen den beiden Isoformen unterschieden, und die Expression auf Proteinebene nicht untersucht. Das Ziel dieser Dissertation war es, zu untersuchen ob sich die Expression von VEGFR-1 und sVEGFR-1 auf mRNA- und Proteinebene in Endothel- und Brustkrebszellen unter Hypoxie und Normoxie zugunsten der einen oder anderen Isoform hin verschiebt.

Material und Methoden: Die experimentelle Basis dieser Arbeit sind Zellkulturen von Endothel- (HUVEC) und Brustkrebszelllinien (MCF-7 und T47D), welche kontrollierter Hypoxie ausgesetzt wurden. Im anschliessenden Vergleich mit unter Normoxie kultivierten Zellen wurde mittels RT-PCR, Western Blot und ELISA die Expression von transmembranärem und löslichem VEGFR-1 auf mRNA- und Proteinebene quantifiziert.

Resultate: Unter Hypoxie ist im Vergleich zu Normoxie kein signifikanter Unterschied in der Expression von VEGFR-1 und sVEGFR-1 mRNA in allen drei getesteten Zelltypen zu messen. Die Unterschiede der VEGFR-1-Protein-Konzentration in Zelllysat und Medium unter hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen sind für alle getesteten Zeitpunkte (0 h, 24 h und 48 h), sowie für alle getesteten Zelltypen statistisch nicht signifikant. Für HUVEC-Zellen

konnte eine statistisch signifikante Steigerung der Expression von VEGF im Medium unter Hypoxie versus Normoxie zum Zeitpunkt 48 h nachgewiesen werden.

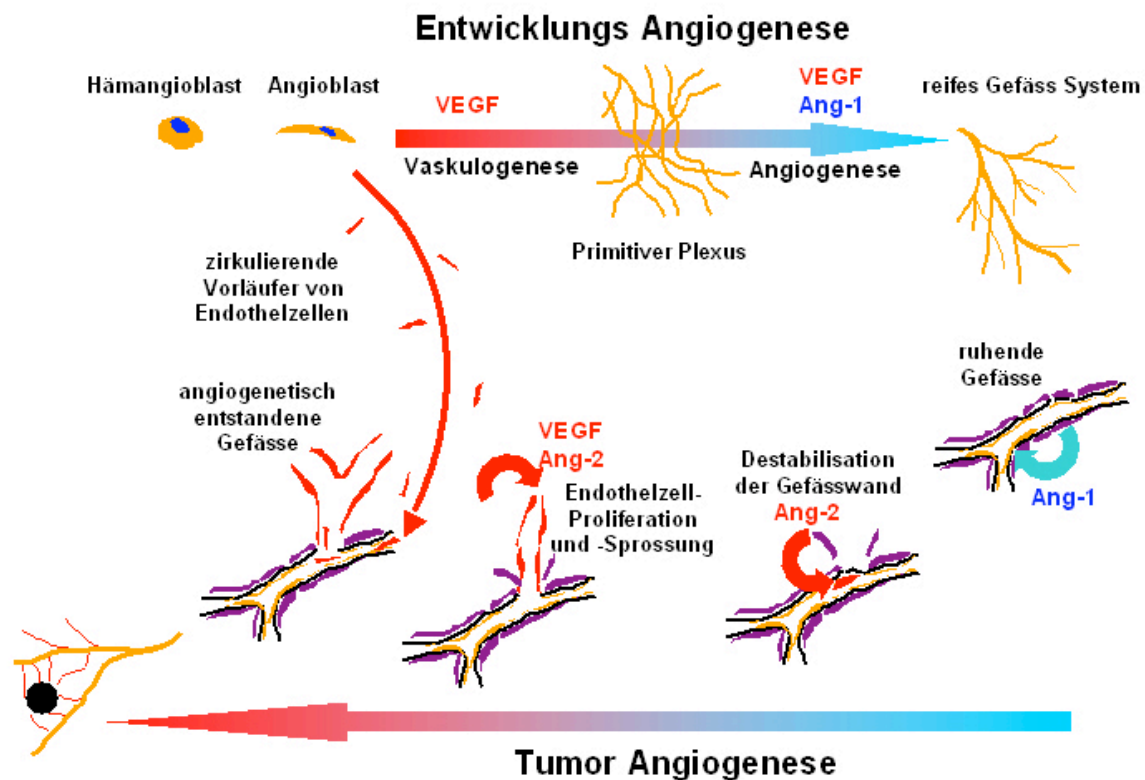
Schlussfolgerung: Hypoxie scheint als alleiniger Faktor die unterschiedliche Expression von VEGFR-1 und sVEGFR-1 innerhalb von 48 h nicht zu regulieren. Die gesteigerte Expression von VEGF oder eine längere Inkubationszeit könnte für die in früheren Publikationen gezeigte erhöhte Expression von VEGFR-1 verantwortlich sein.

2 Einführung

2.1 Tumorangiogenese

Die Progression einer gesunden Zelle zu einer maligne transformierten Zelle und schliesslich zu einem Tumor bedingt, dass diese Zelle fortwährend proliferiert, und sich den endogenen Kontrollen von Zell-Zyklus und DNA-Schäden, den Einflüssen von externen inhibitorischen Faktoren, und schliesslich dem Zelltod entzieht. Dies geschieht durch die Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen (z. B. Ras), die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen (z. B. p53), und die Hinauf-Regulierung von anti-apoptotisch wirksamen (z. B. Bcl-2) und immortalisierenden (z. B. hTERT) Faktoren¹. In den vergangenen Jahren wurde jedoch klar, dass diese Zell-autonomen Ereignisse nicht genügen, um aus einer Tumorzelle einen klinisch manifesten Tumor entstehen zu lassen. Ein Tumor benötigt für Wachstum, Invasion und Metastasierung „Unterstützung“ seitens des normalen, ihn umgebenden Gewebes. Dieses Gewebe, welches auch als Tumor-Stroma bezeichnet wird, besteht im wesentlichen aus Fibroblasten, infiltrierenden Entzündungszellen wie Monozyten/Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten, Blut- und lymphatischen Endothelzellen². Vor allem aber legt sich ein Tumor zur Versorgung mit Nährstoffen selber ein Gefässnetz an, ein Vorgang der als tumorbedingte Gefässneubildung oder Tumor-Angiogenese bezeichnet wird. Bis vor kurzem war man der Ansicht, dass sich neue Blutgefässe nach der Geburt nur durch Proliferation und Migration von Endothelzellen aus bereits bestehenden Gefässen bilden können. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass Vorläufer von Endothelzellen aus dem Knochenmark, die im Blut von gesunden Menschen und Tieren zirkulieren, ebenso bei Gewebs-Ischämie und Krebs neue Gefässe bilden können³. Diese zirkulierenden Endothelzellen können sich am Ort der Angiogenese festsetzen und die

Gefäßneubildung unterstützen, vermutlich durch Differenzierung vor Ort zu reifen Endothelzellen. Bei fehlender Tumor-Angiogenese tritt der Tumor in einen Zustand des „Schlafes“, oder auf Englisch *dormancy*, welcher durch ein Gleichgewicht zwischen Zell-Proliferation und Apoptose gekennzeichnet ist. Die Tumormasse kann sich dabei bei einem Volumen von wenigen Kubik-Millimeter (entsprechend 10^5 bis 10^6 Zellen) über längere Zeit hinaus stabilisieren⁴. Neben ihrer ernährenden Funktion erleichtern Tumorgefäße auch das Eindringen von Tumorzellen in den Blutkreislauf, und tragen damit zur Entstehung von Fernmetastasen bei. Dies geschieht durch die tumor-abhängige Expression von pro-angiogenen Proteinen, hauptsächlich Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)⁵.



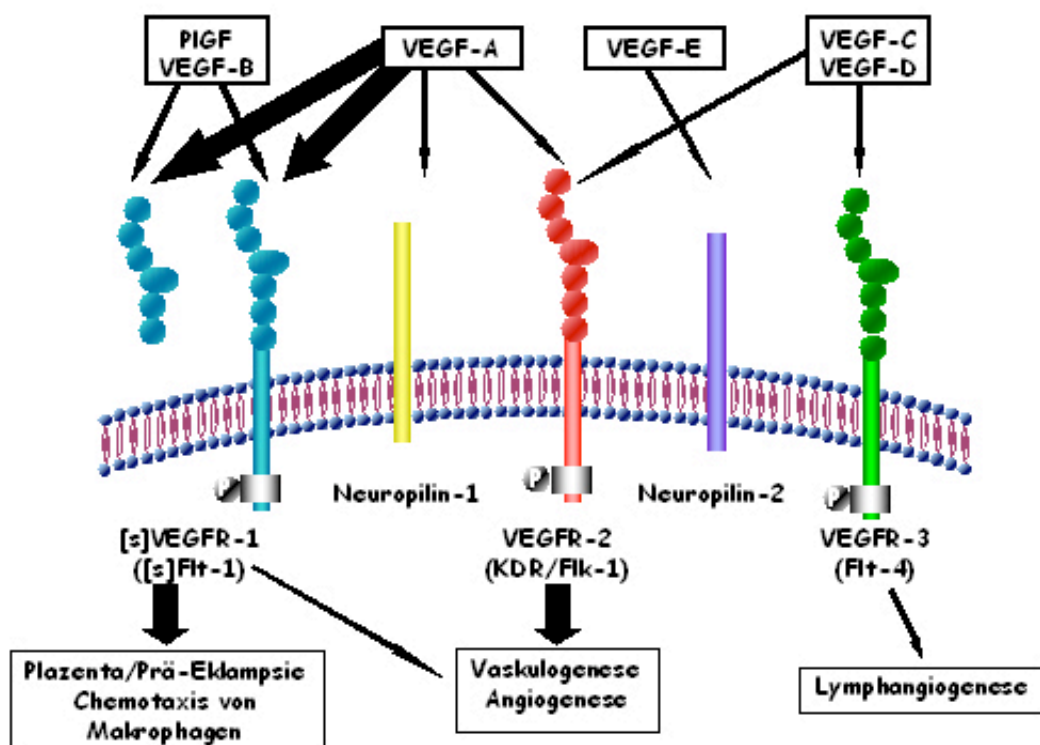
Figur 1: Normale Bildung neuer Blutgefäße (Entwicklungs-Angiogenese) und Tumor-induzierte Angiogenese.

Unter dem Einfluss von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) proliferieren und differenzieren sich Endothelzellen aus ihren Vorläufern (Hämangioblasten und Angioblasten), und bilden einen primitiven, wenig differenzierten primären Gefäßplexus (Vaskulogenese). Angiopoietin (Ang-1) induziert die Umformung des Gefäßplexus durch Teilung der Endothelzellen, selektiven Umbau, und Anlagerung von Perizyten, so dass durch Gefäßaussprossung sekundär ein hierarchisch gegliedertes, reifes Gefäß-System entsteht (Angiogenese).

Bei der tumor-induzierten Angiogenese destabilisiert Angiopoietin-2 (Ang-2) die Gefäßwände der reifen Blutgefäße, und ermöglicht damit Proliferation und - unter Mitwirkung von VEGF und anderen angiogenen Faktoren - Auswanderung ruhender Endothelzellen, um neue Gefäße zu bilden. Vorläufer von Endothelzellen aus dem Knochenmark finden sich im peripheren Blut und am Ort der Angiogenese⁶.

2.2 VEGF und das VEGF-Rezeptor-System

VEGF-A, der wichtigste Vertreter der VEGF-Familie, ist einer der Hauptakteure in der Vermittlung der Angiogenese. VEGF-A bindet im wesentlichen an die Rezeptoren VEGFR-1, und VEGFR-2. Dabei ist die Bindung an VEGFR-1 zwar 10-fach stärker, als die Bindung an VEGFR-2, die Hauptwirkung, Vaskulogenese und Angiogenese, wird jedoch über die VEGFR-2-assoziierte Tyrosinkinase entfaltet, während die VEGFR-1-assoziierte Tyrosinkinase bestenfalls eine sehr untergeordnete Rolle bei der Gefäßneubildung spielt. Weitere Vertreter der VEGF-Familie entfalten Ihre Wirkung in der Lymphangiogenese über den VEGF-Rezeptor-3. Die Bindung von VEGF an die Neuropiline von Tumorzellen scheint deren Proliferation und die Tumorangiogenese zu verstärken⁷.



Figur 2: VEGF und das VEGF-Rezeptor-System (nach Shibuya et al., modifiziert⁸).

VEGFR-1 als natürlicher negativer Regulator der Angiogenese

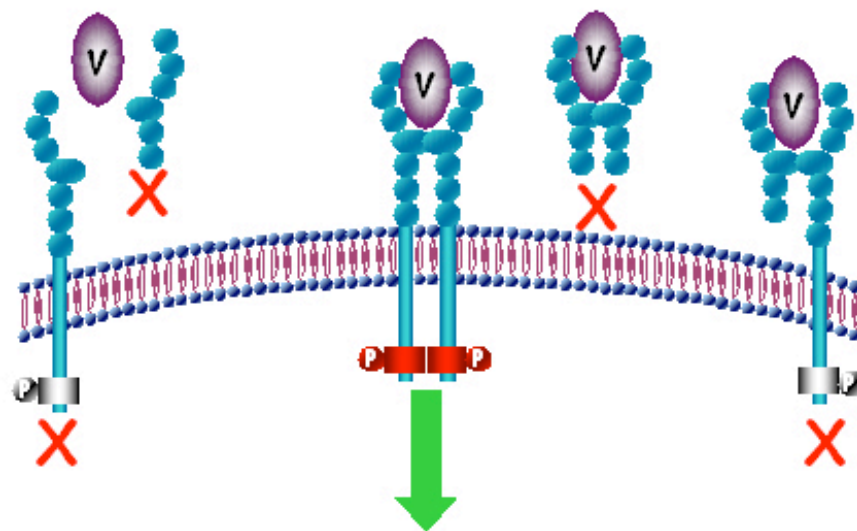
VEGFR-1 (oder Flt-1, von **FMS-like tyrosine kinase-1**) wird auf der Oberfläche von Endothelzellen, Leukozyten, und Tumorzellen exprimiert⁹. Während sich das Hauptaugenmerk der Forschung in den vergangenen Jahren vor allem auf den positiven Regulator der Angiogenese, VEGF und VEGFR-2, gerichtet hat, mit dem Bemühen, die Tumor-Angiogenese über diesen Mechanismus zu hemmen, ist die Bedeutung des negativen Regulators der Angiogenese, VEGFR-1, erst seit kurzer Zeit ins Zentrum des Interesses gerückt.

VEGF bewirkt durch die Bindung an den VEGFR-1 eine Paarbildung (Dimerisierung) der zwei Rezeptoren. Dies führt nur im Fall einer Dimerisierung von zwei membranständigen Rezeptoren (Homodimerisierung) zu einer Signaltransduktion (grüner Pfeil) der assoziierten Tyrosinkinase. In allen anderen Fällen, in denen VEGFR-1 entweder mit seinem löslichen Isotypen, oder mit einem anderen VEGF-Rezeptor (Heterodimerisierung) dimerisiert, wird VEGF durch die Bindung an der Entfaltung seiner angiogenen Wirkung gehindert¹⁰. VEGFR-1 wird als ein negativer Regulator der Angiogenese angesehen, indem er VEGF bindet und damit dessen Wirkung neutralisiert^{11,12}.

Interessanterweise ist VEGFR-1 auch ein Schlüsselrezeptor für die chemotaktische Migration von Monozyten und Makrophagen entlang eines VEGF-Gradienten¹³. VEGFR-1, welcher auf Karzinomzellen exprimiert wird, besitzt auch eine funktionelle Tyrosinkinase, weshalb über eine pro-metastatische Wirkung von VEGFR-1 spekuliert wurde, indem Tumorzellen ähnlich wie Makrophagen entlang eines VEGF-Gradienten migrieren könnten⁹. In der Plazenta spielt VEGFR-1 bei der Prä-Eklampsie vor allem eine Rolle als negativer Regulator der Angiogenese, wobei diskutiert wird, ob eine erhöhte Konzentration von löslichem VEGFR-1 in den

Placentae von prä-eklampsischen Müttern zu einer reduzierten Angiogenese und damit Durchblutung der Placenta beiträgt¹⁴.

Eine wichtige physiologische anti-angiogene Rolle von VEGFR-1 wurde kürzlich für die Hornhaut des Auges aufgezeigt. Dabei wird die unerwünschte Vaskularisierung der Cornea durch die natürliche Expression von löslichem VEGFR-1 verhindert. Interessanterweise zeigte sich bei *knock-down*-Experimenten, bei denen selektiv die RNA von VEGFR-1 im Tiermodell ausgeschaltet wurde, nur eine Vaskularisierung der Cornea, wenn die lösliche Isoform, aber nicht, wenn die membranständige Form von VEGFR-1 ausgeschaltet wurde. Manatees (Seekühe mit Verwandtschaft zu den Elefanten), die einzigen Lebewesen mit vaskularisierter Cornea, exprimieren keinen löslichen VEGFR-1 in der Cornea¹⁵.

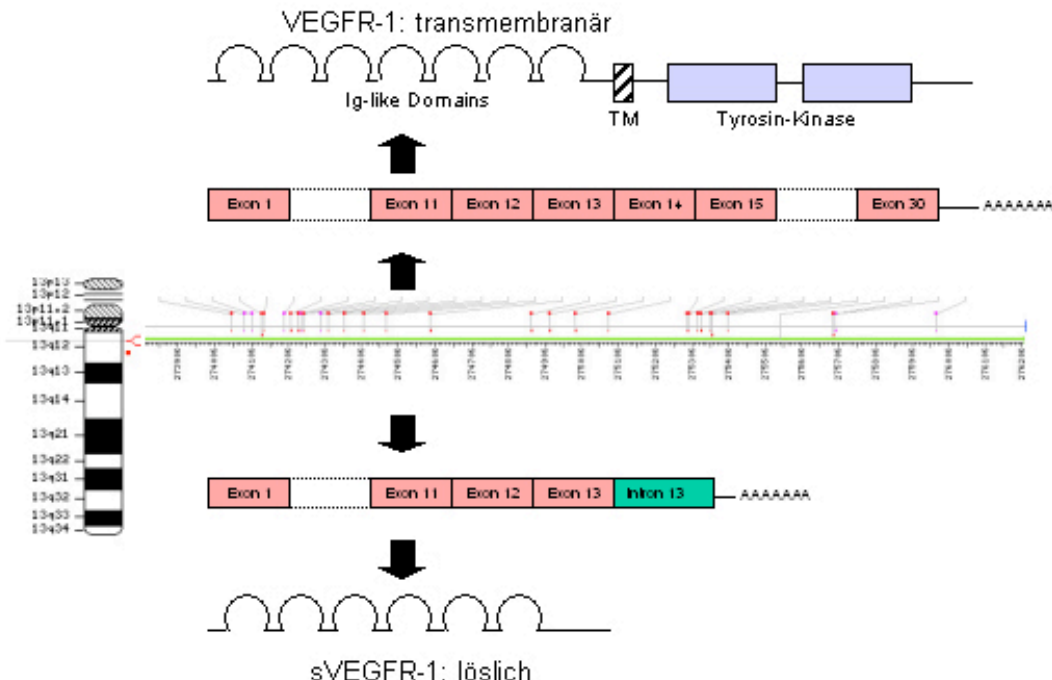


Figur 3: Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1).

Hetero- und Homodimerisierung von VEGFR-1 nach Bindung an VEGF (nach Shibuya et al., modifiziert⁸).

2.3 Isoformen von VEGFR-1 durch Alternatives Splicing

Obwohl das Alternative Splicing der VEGFR-1 prä-mRNA zur Translation von zwei unterschiedlichen Proteinen führt, der 185 kDa schweren membranständigen (VEGFR-1, oder FLT-1), und der 110 kDa schweren löslichen Isoform (sVEGFR-1, oder sFLT-1)¹⁶, ist es unbekannt, ob sich die lösliche Isoform sVEGFR-1, welche im Serum von gesunden Probanden und Tumorpatienten gefunden wird, von der alternativ gespleissten prä-mRNA, oder einer proteolytische Spaltung des membranständigen Rezeptors herleitet. Auch die zelluläre Herkunft des im Serum gefundenen sVEGFR-1 ist unbekannt; es könnte von Endothelzellen, von Leukozyten aus dem Blut oder Knochenmark, oder von Tumorzellen stammen. Zusätzlich ist nicht bekannt, welche Faktoren das Alternative Splicing zugunsten der einen oder anderen Isoform beeinflusst.



Figur 4: Das Alternative Splicing von VEGFR-1. Transkription der VEGFR-1-prä-mRNA vom Genabschnitt auf Chromosom 13q, und alternatives Splicing, welches zu einem membranständigen Protein mit 7 *Ig-like Domains*, einem transmembranären Abschnitt (TM), und einer funktionellen Tyrosinkinase, oder einem löslichen Protein mit 6 *Ig-like Domains* führt (Graphik von Martin Zweifel nach¹⁰).

Die Aufschlüsselung der Mechanismen und der Faktoren, welche die unterschiedliche Expression der VEGFR-1 Isoformen beeinflusst, ist von grossem Interesse. Kürzlich wurde gezeigt, dass sVEGFR-1 im Serum erhöht ist in Patienten nach chirurgischer Resektion eines kolorektalen Karzinoms, aber erniedrigt nach Chemotherapie¹⁷.

Diese Beobachtung impliziert, dass eine chirurgische Tumorentfernung mit einer anti-angiogenen Reaktion des Körpers einhergeht, wohingegen die Applikation von Chemotherapie eine pro-angiogene Reaktion hervorruft.

Die meisten Experimente mit Tumorzelllinien im Allgemeinen, werden unter „normoxischen“ Bedingungen bei 20% O₂-Anteil durchgeführt. Physiologische Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe sind jedoch häufig deutlich niedriger, je nach Gewebetyp und Organ zwischen 2% und 5%. „Hypoxische Nischen“ sind in Leber und Knochenmark zu finden, wo die Sauerstoffkonzentrationen sogar noch tiefer, oder sogar anoxisch sind¹⁸.

Gerber et al. zeigten, dass VEGFR-1-mRNA in Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) in Hypoxie hinaufreguliert ist, wobei sie bloss die gesamte VEGFR-1 mRNA quantifizierten, und nicht nach löslicher und membranständiger Isoform unterschieden. Zudem wurde die Expression auf Proteinebene nicht untersucht¹⁹.

3 Ziel dieser Dissertation

Dieses Projekt knüpfte an eine Vorarbeit an, in welcher die Expression der mRNAs für die beiden VEGFR-1 Isoformen in HUVEC unter Hypoxie quantifiziert wurde²⁰.

Die Einschränkungen dieser Experimente bestanden darin, dass aus technischen Gründen keine kontrollierten hypoxischen Bedingungen geschaffen werden konnten, und diese auch nicht mittels eines „Markers“ für Hypoxie, wie z. B. HIF-1 α , nachgeprüft, und keine Daten zur Expression auf Proteinebene gewonnen wurden.

Deshalb galt es, Zellkulturen von Endothelzellen und zwei Brustkrebs-Zelllinien anzulegen, diese kontrollierter Hypoxie auszusetzen, und anschliessend im Vergleich mit unter Normoxie kultivierter Zellen mittels reverser Transkription (RT) gefolgt von "quantitative polymerase chain reaction" (q-PCR), Western blot und ELISA die Expression von VEGFR-1 und sVEGFR-1 auf mRNA und Proteinebene zu quantifizieren.

Allfällige Unterschiede in der Expression könnten Hinweise darauf liefern, ob Hypoxie das Alternative Splicing von VEGFR-1 beeinflusst, und ob die Resultate mit den in den Patienten gemessenen Serumwerten in ihrer Grössenordnung vergleichbar sind.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsanordnung und Zellkulturen

Die Versuchsanordnung ist schematisch in Figur 5 dargestellt. Brustkrebs-Zelllinien (MCF-7 und T47D) sowie HUVEC (human umbilical vein endothelial cells, humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen) wurden für jedes der zwei unabhängigen Experimente aus flüssigem Stickstoff aufgetaut und in Kultur gebracht. Als Medium wurde DMEM (Gibco/Invitrogen, Lausen, Schweiz, 31966-021) für die Brustkrebszellen und EGM-2 (Clonetics, Lonza, Basel, Schweiz, CC-4176) für HUVEC verwendet. Die Zellen wurden jeweils mit Trypsin/EDTA (Gibco/BRL, Lausen, Schweiz, 25300-062) vom Schalenboden abgelöst und gesplittet, bis genügend Zellmaterial mit 80% Konfluenz für die fünf verschiedenen Erntebedingungen zur Verfügung standen (t_0 = Zeitpunkt null; t_{24N} = nach 24 h in Normoxie; t_{24H} = nach 24 h in 0,1% Hypoxie; t_{48N} nach 48 h in Normoxie; t_{48H} nach 48 h in 0,1% Hypoxie). Für jede Zelllinie und jede Bedingung wurde eine 10 cm Schale (Überstand für Immunpräzipitation (IP) und Zelllysate für Westernblot (WB)) sowie eine "6-well" Schale (ELISA-Duplikate; PCR-Duplikate und Duplikate für die Zellzählung) angelegt.

24 h vor der Ernte der betreffenden Kultur wurde jeweils das Medium gewechselt. 32 h vor t_0 wurden alle Zellen ausgebracht („geseedet“), um den t_0 -Zellen vor dem ersten Mediumwechsel 8 h zur Erholung von der Behandlung mit Trypsin/EDTA zu gewährleisten. Die Hälfte der übrigen Zellen (t_{24H} und t_{48H}) wurden 30 h vor t_{24} in die Hypoxiekammer (Ruskin, Bridgend, UK, InVivo400) transferiert, wobei nach 6h (24 h vor t_{24}) ein Mediumwechsel mit hypoxischem Medium durchgeführt wurde. Auch der Mediumwechsel bei t_{24} für die t_{48H} -Zellen erfolgte mit hypoxischem Medium. Die Ernte der hypoxischen Proben wurde jeweils in der Hypoxiekammer

durchgeführt. Diese Versuchsanordnung wurde gewählt, um andere Einflüsse als Hypoxie, wie zum Beispiel die Akkumulation von Stoffwechselprodukten oder pH-Änderungen, möglichst klein zu halten. Der direkte Vergleich mit den identisch behandelten Zellkulturen in Normoxie wiederum sollte allfällige Effekte eliminieren, welche durch den Mediumwechsel hervorgerufen werden können.

4.2 Zellzählung

Die Zellzählung wurde jeweils im Duplikat (2 Wells pro 6-Well-Platte) durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und danach mit 100 µl Trypsin/EDTA abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde mit 1 ml Medium geblockt und die im Medium suspendierten Zellen in ein Eppendorf tube überführt. 10 µl von der gut geschüttelten Suspension wurde in einem weiteren Eppendorf tube mit 10 µl 0,1% Trypanblau-Lösung versetzt und unter dem Mikroskop in den vier Quadranten der Neubauerkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm²) die Zellen gezählt. Der Durchschnitt der vier Quadranten wird mit 2×10^4 multipliziert, um die Anzahl Zellen pro ml zu berechnen.

4.3 RNA-Extraktion und RT-qPCR

Totale RNA wurde aus Zelllysaten extrahiert, nachdem diese unter Hypoxie, nach Absaugen des Mediums, mit 350 µl RLT-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) lysiert, auf Trockeneis eingefroren, und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert wurden. Für die RNA-Extraktion wurde ein Kit von Qiagen verwendet, das insbesondere kontaminierende gDNA mittels eines zusätzlichen Purifikationsschrittes mit einem ionenaustauschenden Harz effizient entfernt. Dies ist insofern wichtig, als Primer und Probe für sVEGFR-1 durch das fehlende Herausschneiden des Introns 13 aus der sVEGFR-1-prä-mRNA nicht zwischen gDNA und cDNA unterscheiden können. Forward- und Reverse-Primer und die

Fluoreszenz-Sonden (Probes) für sVEGFR-1 und VEGFR-1 wurden mittels der PrimerExpress-Software V2.0.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, Kalifornien, USA) entworfen. Sie haben folgende Sequenz, wobei der Forward Primer für beide Splicingvarianten derselbe ist, und die Probe für VEGFR-1 die Verbindung zwischen den Exons 13 und 14 überspannt:

VEGFR-1:

Probe: 5'-TGCTTCCTGATCTCTGATTGTAATTTCTTCTTG-3'

Forward Primer: 5'- GCAAGATTCAGGCACCTATGC-3'

Reverse Primer: 5'- CTGAGGTTTCGCAGGAGGTATG-3'

sVEGFR-1:

Probe: 5'-TGTTGCAGTGCTCACCTCTGATTGTAATTTCTT-3'

Forward Primer: 5'-GCAAGATTCAGGCACCTATGC-3'

Reverse Primer: 5'- AGATCCGAGAGAAAACAGCCTTT-3'

Als Mass für die total eingesetzte RNA wurde einerseits die Konzentration vor der RT mittels Absorption von UV-Licht bei 260 nm bestimmt, und andererseits der Cut-off der PCR-Amplifikationskurve in Bezug zum "housekeeping" Gen β -Actin normalisiert. Primers und Probe für β -Actin wurden als „Pre-developed assay reagents (PDAR)“ von Applied Biosystems bezogen.

2 μ g jedes RNA-Extraktes wurde anhand des Protokolls des Herstellers mittels random hexamer primers (TaqMan Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in cDNA übersetzt. Die qPCR wurde mit einem TaqMan Universal PCR Master Mix durchgeführt, mit einer Konzentration der Primers und Probes von 900 nM, respektive 200nM (End-Reaktionsvolumen 25 μ l mit je 100 ng reverse transkribiertem RNA-Extrakt), in einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) für total 40 Zyklen.

4.4 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung von VEGFR-1, VEGF und PIGF in wurden Double-Antibody-Sandwich-ELISAs (R&D Systems, Abingdon, UK) durchgeführt. Für die Bestimmung aus dem Kulturmedium wurden jeweils 1 ml Überstand pro Vertiefung (im Duplikat) direkt verwendet. Für die Bestimmung aus den Zellen wurde das Medium unter Hypoxie abgesaugt, und die Zellen mit 100 µl eiskaltem RIPA-Puffer²¹ nach Zugabe von 1000x Proteininhibitor (Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz, P2714) lysiert und in nach Überführung in ein Eppendorf-Röhrchen bei -80°C eingefroren.

Die Konzentration von VEGFR-1, VEGF und PIGF wurden in pg/ml berechnet, für die Zell-Lysate mit dem Gesamt-Proteingehalt des Lysates normalisiert, und als pg/mg total protein umgerechnet. Die Proteinbestimmung wurde mittels des BCA Protein Assays (Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, #23228) vorgenommen. Die 96-Well-Mikroplatten wurden in einem Photospektrometer der Marke DigiScan (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Österreich) bei 550 nm abgelesen.

4.5 Immunopräzipitation

Der Überstand der 10 cm Schalen wurde in 15 ml Falcon tubes überführt und bei -80°C eingefroren. 30 µl der in Ethanol aufgeschlämmten Protein G-Sepharose-Beads (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland, 17-0618-01) wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die zentrifugierten Beads wurden mit 500 µl resuspendiert und mit 1 mg polyklonalem goat-anti-human VEGFR-1 (Flt-1) Antikörper (R&D, Minneapolis, MN, USA, AF231) versetzt und 2 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Beads dreimal mit kaltem PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Um die unspezifischen Bindungen der Beads zu besetzen, wurden sie mit 10 µl 10% BSA blockiert. Die tiefgefrorenen Überstand-Proben der 10 cm-Schalen wurden auf Eis aufgetaut und

das Probevolumen an den Proteingehalt des betreffenden Zelllysats (protein assay 23228, Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) adaptiert. Diese Überstand-Proben wurden mit den Beads versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads zentrifugiert, vom Überstand befreit und dreimal mit kaltem IP Wasch-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,02% NaN₃) gewaschen. Zur Lösung und Denaturierung der Proteine wurden die Beads mit 20 µl Sample-Puffer (Tris-HCl pH 6,8, 10% Natriumdodecylsulfat, 50% Glycerin, 1% Bromphenolblau, 10% 1 M Dithiotreitol) versetzt und 5 min auf 96°C erhitzt. Zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis des löslichen VEGFR-1 wurde ein Western Blot durchgeführt.

4.6 Western Blot

Die Zellen der 10 cm Schalen wurden mit 500 µl 1000x Proteininhibitor (Sigma, P2714) versetztem RIPA-Puffer ²¹ lysiert, in ein Eppendorf tube überführt und bei -80°C eingefroren. Die Totalproteinmenge der lysierten Zellen der 10 cm Schalen wurde durch einen Protein assay (Pierce BCA, 23228) bestimmt. 60 µg (MCF-7, T47D) resp. 30 µg (HUVEC) denaturiertes Totalprotein (mit Proben-Puffer (Tris-HCl pH 6,8, 10% Natriumdodecylsulfat, 50% Glycerin, 1% Bromphenolblau, 10% 1 M Dithiotreitol) versetzt und 5 min auf 96°C erhitzt) sowie der Proteinmarker (Biolabs, P7708S) wurden auf das Gel geladen und eine SDS-PAGE durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, T830.1) transferiert und die unspezifischen Bindungen mit 3% in PBS gelöstem fettfreiem Milchpulver geblockt. Die Membran wurde mit dem primären (über Nacht bei 4°C) und, nach Waschen in TBS, mit dem sekundären (1h bei RT) Antikörper inkubiert. Als Antikörper wurden verwendet: goat-anti-human VEGFR-1-Antikörper (R&D, AF231; 1:1000), mouse-anti-human HIF-1α-Antikörper (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA, 610959; 1:1000), rabbit-anti-human

VEGFR-2-Antikörper (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland, 676488; 1:1000), mouse-anti-human β -Actin-Antikörper (Sigma, A5441; 1:5000), HRP-konjugierter rabbit-anti-goat-Antikörper (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland, P0449; 1:2000), HRP-konjugierter goat-anti-mouse Antikörper (Pierce, 31340; 1:15'000) und HRP-konjugierter goat-anti-rabbit-Antikörper (Pierce, 1858415; 1:2000). Die Membran wurde 5 min mit dem Chemielumineszenzsubstrat (Pierce, 34076) inkubiert und das Signal mittels Röntgenfilm bzw. mit einer digitalen Kamera registriert.

4.7 Stichprobenzahl und Statistik

Die Experimente wurden in zwei unabhängigen Versuchen jeweils im Duplikat durchgeführt. Zwecks besserer Interpretierbarkeit wurden die Daten als Balkengrafiken \pm Standardabweichung dargestellt. Es wurden sowohl parametrische als auch nichtparametrische Tests zur Berechnung der Signifikanz (p) von Unterschieden zwischen den Gruppen (ungepaarte Daten) verwendet (ANOVA, resp. Kruskal Wallis-Test für den Vergleich von mehreren Gruppen miteinander, und T Test, resp. Mann Whitney-U-Test für den Vergleich zwischen zwei Gruppen). Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

5 Resultate

5.1 Wachstum und Viabilität der Zellkulturen

Um das unterschiedliche Wachstumsverhalten der getesteten Zelllinien unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen (0,1%) zu bestimmen, wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h mittels Neubauerkammer ausgezählt. Die ermittelten Zellzahlen für die humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) und die humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und T47D sind Tabelle 1 aufgeführt (Durchschnitt \pm Standardabweichung; n=4).

Zur Messung der Viabilität wurden die Zellen zusätzlich mit Trypanblau angefärbt, um zwischen lebenden (trypanblau-negativen) und toten (trypanblau-positiven) Zellen zu unterscheiden.

5.1.1 Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)

Zum Startzeitpunkt des Experiments (t_0) wurden $0,38 \pm 0,11$ Millionen Zellen pro pro Well einer 6-Well-Platte gezählt. Die Zellzahl nahm nach 24 h zu und erreichte unter Normoxie mit $0,68 \pm 0,18$ Mio Zellen pro 6-well plate annähernd die doppelte Zellzahl von t_0 entsprechend einer Generationszeit von 24 h. Nach 48 h war keine weitere Zunahme der Zellzahl mehr zu verzeichnen ($0,62 \pm 0,32$ Mio Zellen pro 6-well), weil die Zellen Konfluenz erreicht hatten. Unter hypoxischen Bedingungen stagnierte das Zellwachstum: nach 24 h $0,40 \pm 0,16$ Mio Zellen pro 6-well und nach 48 h $0,26 \pm 0,18$ Mio Zellen pro 6-well.

Der basale Anteil (t_0) von trypanblaupositiven (= toten) Zellen lag bei 4,98%. Nach 24 h verdoppelte sich der Anteil toter Zellen unter Normoxie (8,87%) und Hypoxie (9,66%). Nach 48 h stieg dieser Wert auf 14,23% unter Normoxie und 15,64% unter

Hypoxie. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 1 und Figur 6 dargestellt.

5.1.2 Humane Brusttumorzelllinie MCF-7

Zu Beginn des Experiments (t_0) befanden sich $1,68 \pm 0,59$ Mio Zellen pro Well einer 6-Well-Platte. Dieser Wert ist etwa viermal höher als bei den HUVEC-Zellen, was unter anderem auf die geringere Zellgrösse zurückzuführen ist. Unter Normoxie wurden nach 24 h $2,60 \pm 1,31$ Mio Zellen pro 6-well, nach 48 h $4,20 \pm 0,74$ Mio Zellen pro 6-well gezählt. Das entspricht einer Generationszeit von ca. 40 h. Im Gegensatz dazu war unter Hypoxie nach 24 h kein Wachstum mehr zu verzeichnen ($1,89 \pm 0,35$ Mio Zellen pro 6-well). Nach 48 h Hypoxie ging die Zellzahl auf $0,97 \pm 0,56$ Mio Zellen pro 6-well zurück.

Zum Zeitpunkt t_0 waren 6,35% der Zellen trypanblaupositiv. Unter Normoxie stieg dieser Wert nach 24 h auf 15,23% an. Dieser Wert war konstant (nach 48 h 14,36%). Unter Hypoxie hingegen waren nach 24 h ein Viertel aller Zellen tot (25,45%). Dieser Wert war nach 48 h unverändert (25,67%). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Figur 7 veranschaulicht.

5.1.3 Humane Brusttumorzelllinie T47D

Die Resultate der Experimente mit T47D-Zellen sind in Tabelle 1 und Figur 8 dargestellt. Die Anzahl der Zellen zu Beginn des Experiments war mit $1,51 \pm 0,80$ Mio Zellen pro Well einer 6-Well-Platte vergleichbar mit den MCF-7 Zellen. Nach 24 h gab es keinen messbaren Unterschied in der Zellzahl zwischen Normoxie ($2,78 \pm 1,04$ Mio Zellen pro 6-well) und Hypoxie ($2,50 \pm 1,22$ Mio Zellen pro 6-well). Interessanterweise zeigte sich nach 48 h ein deutlicher Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie. Unter Normoxie wurden $4,13 \pm 0,61$ Mio Zellen pro 6-well

gezählt, im Vergleich zu $0,72 \pm 0,78$ Mio unter Hypoxie. Demzufolge liegt die Generationszeit mit ca. 30 Stunden deutlich unter der von MCF-7 mit ca. 40 h.

Zum Zeitpunkt t_0 lag der Anteil von trypanpositiven Zellen bei 2,73%. Nach 24 h erreichte er unter Normoxie 4,63% und unter Hypoxie 4,45%. Nach 48 h lag der Wert trypanpositiver Zellen unter Normoxie bei 2,97%, im Vergleich zu 10,03% unter Hypoxie.

5.2 RT-qPCR zur Quantifizierung von VEGFR-1 und sVEGFR-1 mRNA

Für HUVEC (Figur 9) und MCF-7-Zellen (Figur 10) zeigte die Quantifizierung der mRNA für VEGFR-1 und sVEGFR-1 eine mehr oder weniger ausgeprägt verstärkte Expression von sVEGFR-1 gegenüber VEGFR-1 unter Normoxie und Hypoxie und zu allen Zeitpunkten, während T47D-Zellen (Figur 7) VEGFR-1 und sVEGFR-1 in gleicher Menge zu exprimieren schienen. Die stärkste Expression von beiden Isoformen von VEGFR-1 schien in allen drei Zelltypen nach 48 Stunden unter Normoxie zu finden sein. Die Unterschiede der VEGFR-1- und sVEGFR-1-Expression unter Normoxie und unter Hypoxie waren jedoch relativ gering, und wegen der grossen Variation (Streuung der Werte) in keiner der Zelltypen und zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

5.3 ELISA zum Nachweis von VEGFR-1, VEGF und PIGF

5.3.1 ELISA zum Nachweis von VEGFR-1 in Zelllysate und Medium

ELISA wurde aus Zelllysaten und Medium zum Nachweis von VEGFR-1 durchgeführt. Die Unterscheidung von membranständigem und löslichem VEGFR-1 ergibt sich aus dem Vorhandensein der jeweiligen Isoform im mediumfreien Zell-Lysat, respektive im zellfreien Medium, und lässt keinen Rückschluss darauf zu, ob die lösliche Isoform primär aus der alternativ gespleisssten VEGFR-1 prä-mRNA,

oder durch eine proteolytische Spaltung des membranständigen VEGFR-1-Proteins hervorgegangen ist.

Die direkte Vergleichbarkeit von VEGFR-1 und sVEGFR-1 ist dadurch im Gegensatz zur RT-qPCR weniger eindeutig, da VEGFR-1 im Zelllysate in pg/mg Gesamtprotein (Totalprotein), im Medium aber in pg/ml angegeben wird, wobei die Konzentration deshalb auch vom eingesetzten Volumen des Mediums, von der Zeit, wie lange das Medium belassen wird, und von der Degradationsrate des löslichen VEGFR-1 abhängt.

Die Veränderungen der VEGFR-1-Konzentration im Zelllysate und im Medium unter Hypoxie sind im Vergleich zur Normoxie zu den entsprechenden Zeitpunkten statistisch bei wiederum hoher Varianz nicht signifikant. Generell scheinen HUVEC mehr löslichen VEGFR-1 im Vergleich zu membrangebundenem VEGFR-1 zu produzieren (Figur 8) als die beiden Brustkrebszelllinien MCF-7 und T47D (Figuren 13 und 14).

5.3.2 ELISA zum Nachweis von VEGF im Medium

Die Expression von VEGF Protein im Medium zeigte eine statistisch signifikante Erhöhung in HUVEC in Hypoxie *versus* Normoxie zum Zeitpunkt 48 h (Figur 15). Für alle drei Zelltypen zeigte sich die Tendenz einer erhöhten Konzentration von VEGF im Medium unter Hypoxie gegenüber Normoxie zum Zeitpunkt 24 h (Figur 15-17). Beim Zeitpunkt 48 h trifft dies nur noch für HUVEC und T47D zu, aber nicht mehr für MCF-7. Ausser der Erhöhung der VEGF-Konzentration im Medium von HUVEC nach 48 h in Hypoxie waren sämtliche anderen Unterschiede statistisch nicht signifikant.

5.3.3 ELISA zum Nachweis von PlGF im Medium

PlGF wurde im Medium von HUVEC gemessen. Die Unterschiede waren zu allen Zeitpunkten statistisch nicht signifikant (Figur 18).

5.4 Western blots

Zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von HIF-1 α , VEGFR-2 und VEGFR-1 in den Lysaten der drei Zelllinien (HUVEC, MCF-7, T47D) wurde jeweils ein Western blot durchgeführt. Bei jedem Blot wurden Proben aller fünf Erntebedingungen (t₀ = Zeitpunkt null; t_{24N} = nach 24 h in Normoxie; t_{24H} = nach 24 h in 0,1% Hypoxie; t_{48N} nach 48 h in Normoxie; t_{48H} nach 48 h in 0,1% Hypoxie) in der eben genannten Reihenfolge auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Ladekontrollen erfolgten mit β -Aktin. respektive α -Tubulin.

5.4.1 Western blot Analyse VEGFR-1

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Expression von VEGFR-1 untersucht werden. Das Molekulargewicht dieses Rezeptors beträgt 185 kDa. Im Lysat aller drei Zelltypen konnte ein Signal für VEGFR-1 unter allen getesteten normoxischen und hypoxischen Bedingungen dargestellt werden. Die Bande bei 185 kDa ist in HUVEC und T47D unter Hypoxie zu beiden Zeitpunkten schwächer als unter Normoxie. In MCF-7 scheinen die Banden in etwa gleich stark zu sein.

5.4.2 Immunopräzipitation von löslichem VEGFR-1

Zur Anreicherung von sVEGFR-1 in den Überständen der drei Zelllinien (HUVEC, MCF-7, T47D) wurde jeweils eine Immunpräzipitation und zu dessen qualitativen und semiquantitativen Nachweis anschliessend ein Western blot durchgeführt. Bei jedem Blot wurden Proben aller fünf Erntebedingungen (t₀ = Zeitpunkt null; t_{24N} = nach 24 h in Normoxie; t_{24H} = nach 24 h in 0,1% Hypoxie; t_{48N} nach 48 h in Normoxie; t_{48H} nach 48 h in 0,1% Hypoxie) in der eben genannten Reihenfolge auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Das lösliche Fragment hat ein Molekulargewicht von ca 110 kDa. Unter hypoxischen Bedingungen war die Intensität der Banden der Medien von HUVEC und MCF-7 schwächer als jene unter normoxischen

Bedingungen. Aus technischen Gründen (hoher Hintergrund) ist die Interpretation der T47D-Immunpräzipitation schwierig.

5.4.3 Western blot zur Analyse von VEGFR-2

Als Kontrolle wurde die Expression von VEGFR-2 mittels Western blot untersucht. Der genutzte Antikörper detektiert eine Bande von ca. 230 kDa. VEGFR-2 konnte nur in HUVEC, aber nicht in MCF-7 und T47D Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise verschwand das Signal unter Hypoxie. Dieser Effekt ist bereits nach 24 Stunden zu verzeichnen.

5.4.4 Western blot Analyse für Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)

Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) diene zur internen Kontrolle der Hypoxie-Bedingung. Auf dem Western blot ist ein Signal zwischen 100 kDa und 150 kDa für HIF-1 α zu erwarten. Bereits nach 24 h Hypoxie war in allen getesteten Zelllinien HIF-1 α mittels Western blot nachzuweisen. Die Expression von HIF-1 α war auch nach 48 h Hypoxie zu erkennen. Unter Normoxie wurde erwartungsgemäss kein HIF-1 α exprimiert.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression der beiden Splicingvarianten VEGFR-1 und sVEGFR-1 in Zelllysaten von kultivierten HUVEC Endothelzellen und Brustkrebszelllinien (MCF-7 und T47D) quantifiziert, die Konzentration von membranständigem und löslichem VEGFR-1-Protein in Zelllysaten und Kulturmediumüberständen von HUVEC, MCF-7 und T47D Zellen, die Konzentration von VEGF in Kulturmediumüberständen von HUVEC, MCF-7 und T47D Zellen, sowie die Konzentration von PlGF in Kulturmediumüberständen von HUVEC-Zellen unter Normoxie und Hypoxie gemessen.

Dabei konnte Folgendes gezeigt werden: Erstens, in der hier gewählten Versuchsanordnung ist unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie kein signifikanter Unterschied in der Expression von VEGFR-1 und sVEGFR-1 mRNA in allen drei getesteten Zelltypen zu messen. Zweitens, die Unterschiede der VEGFR-1 Proteinkonzentration im Zelllysate und Medium unter hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen sind statistisch nicht signifikant. Dies gilt für alle getesteten Zeitpunkte 0 h, 24 h und 48 h, sowie für alle getesteten Zelltypen HUVEC, MCF-7 und T47D. Drittens, die Expression von VEGF im Medium zeigte für HUVEC eine statistisch signifikante Erhöhung in Hypoxie *versus* Normoxie zum Zeitpunkt 48 h. Eine ähnliche Tendenz, jedoch nicht statistisch signifikant, konnte für alle drei getesteten Zelllinien zum Zeitpunkt 24 h beobachtet werden. Viertens, die Unterschiede der PlGF-Protein-Konzentration im Medium von HUVEC waren zu allen Zeitpunkten statistisch nicht signifikant.

Die physiologische und pathologische Angiogenese, welche die Tumorangio-genese einschliesst, wird von einem Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Molekülen reguliert. Wenn sich das Gleichgewicht zugunsten von Induktoren der

Angiogenese verschiebt, aktiviert ein Prozess, welcher „angiogener Schalter“ oder Englisch „angiogenic switch“ genannt wird, das normalerweise ruhende Gefässnetz, und bringt es dazu, neue Blutgefäße zu bilden²². Einer der wichtigsten pro-angiogenen Signalwege wird von Vertretern der VEGF Familie gebildet, speziell VEGF-A und seine Rezeptoren VEGFR-2 (Flk-1) und VEGFR-3 (Flt-4)²³.

Der VEGF Rezeptor-1 (VEGFR-1 oder Flt-1), ein Rezeptor für VEGF-A und placenta growth factor (PlGF), wird allgemein als antiangiogener Rezeptor angesehen, da die experimentelle Inaktivierung in einer exzessiven Angiogenese resultiert²⁴. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass VEGFR-1 nach Bindung an seinen Liganden VEGFR-2 transphosphorylieren und damit die VEGF-abhängige Angiogenese verstärken kann²⁵⁻²⁷. Neben Endothelzellen¹⁶ wird VEGFR-1 auch von Tumorzellen^{9,28-30}, aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen³¹, Monozyten/Makrophagen¹³, basophilen Granulozyten³², Thrombozyten³³ und Neutrophilen Granulozyten^{34,35} exprimiert. Zwei Isoformen von VEGFR-1, ein langes transmembranäres Protein mit einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne und ein verkürztes lösliches Protein, welchem die transmembranäre und Tyrosinkinase-Domäne fehlen (sVEGFR-1 oder sFlt-1), entstehen durch alternatives Splicing der VEGFR-1 prä-mRNA¹⁶. Es mehren sich jedoch in letzter Zeit die Hinweise darauf, dass auch die proteolytische Spaltung des VEGFR-1-Proteins in die Bildung von sVEGFR-1 involviert sein könnte³⁶⁻³⁸. Beide, VEGFR-1 und sVEGFR-1 üben durch die Sequestrierung von VEGF durch die Bildung von Heterodimeren mit VEGFR-1 und -2 einen dominant-negativen anti-angiogenen Effekt aus^{39,40}. Es wurde gezeigt, dass die alleinige Expression von löslichem sVEGFR-1 als Gegenbalance für eine normale Angiogenese genügt, und Mäuse, deren transmembranäre VEGFR-1-Isoform selektiv ausgeschaltet ist, sich normal entwickeln⁴¹.

Angesichts des Konzeptes, dass sogar nur ein kurzzeitiger „angiogenic switch“, also eine transiente Imbalance zugunsten von pro-angiogenen Faktoren genügt, einen „schlafenden“ (dormant) Tumor zum Wachstum zu bewegen⁴², und der noch weitgehend unverstandenen Tatsache, dass eine Vielzahl von „unentdeckten“ mikroskopischen Tumoren in gesunden Menschen lebenslang nie zu Wachstum und Metastasierung führen^{43,44}, wäre es wichtig die Mechanismen zu verstehen, welche zu einer verstärkten Expression von anti-angiogenen und damit potentiell Tumorwachstums- und Metastasierungs-verhindernden Faktoren wie VEGFR-1 und insbesondere sVEGFR-1 führen.

Dass Hypoxie die Expression von VEGFR-1 mRNA in HUVEC um das doppelte erhöht, wurde ursprünglich von Gerber et al. 1997 in HUVEC¹⁹ gezeigt, von Nagamatsu et al. 2004 in kultivierten placentaren Zytotrophoblastzellen ebenfalls nachgewiesen, in HUVEC aber nicht bestätigt werden⁴⁵. In der experimentellen Anordnung von Gerber et al. fällt im Unterschied zu Nagamatsu et al. und dieser Studie folgendes auf: Erstens wurden HUVEC bis zu 60 h lang ununterbrochen unter „hypoxischen“ Bedingungen kultiviert, wobei die Hypoxie mit 0,1% eigentlich eine Anoxie war, und zweitens wurde das Medium in dieser Zeit nie gewechselt. Zusätzlich konnte die Funktionalität der vermuteten HIF-Bindungsstelle (HBS) innerhalb des *hypoxia response elements* (HRE) im VEGFR-1 Promoter nicht direkt bestätigt werden⁴⁶.

Es ist bekannt, dass Hypoxie via HIF-1 die Expression von VEGF hinaufreguliert^{47,48}. Weiter wurde gezeigt, dass VEGF die Expression von VEGFR-1 hinaufregulieren kann⁴⁹⁻⁵¹. Obwohl in unseren Experimenten die VEGF-Konzentration in Zellkulturüberständen zunimmt, kann davon ausgegangen werden, dass der unter Hypoxie vorgenommene Wechsel des Mediums die VEGF-Konzentration reduziert, und damit eine messbare Heraufregulation von VEGFR-1 verhindert hat. Um diese

Hypothese zu überprüfen, müssten jedoch Vergleichsexperimente durchgeführt werden, wobei bei einer Hälfte der Kulturschalen das Medium gewechselt, und bei der anderen Hälfte das Medium nicht gewechselt werden sollte.

Ein weiterer Aspekt betrifft die Vergleichbarkeit von VEGFR-1 und sVEGFR-1 mRNA- und Protein-Mengen. In den Experimenten dieser Arbeit wurde ELISA aus Zelllysaten und Medium zum Nachweis von VEGFR-1 durchgeführt. Die Unterscheidung von membranständigem und löslichem VEGFR-1 ergibt sich aus dem Vorhandensein der jeweiligen Isoform im mediumfreien Zelllysate, respektive im zellfreien Medium, und lässt keinen Rückschluss darauf zu, ob die lösliche Isoform primär aus der alternativ gespleisssten VEGFR-1 prä-mRNA, oder durch eine proteolytische Spaltung des membranständigen VEGFR-1-Proteins hervorgegangen ist.

Die direkte Vergleichbarkeit von VEGFR-1 und sVEGFR-1 protein ist im Gegensatz zur quantitativen RT-PCR erschwert, da VEGFR-1 im Zelllysate in pg/mg Gesamtprotein (total protein), und im Medium in pg/ml angegeben wird. Die Normalisierung von VEGFR-1 im Medium zum Gesamtproteingehalt der entsprechenden Zelllysate wäre eine Möglichkeit, eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen, ist aber unüblich, und berücksichtigt Änderungen der Zellzahl in beide Richtungen nicht entsprechend. Weiter ist die Konzentration im Medium von der Dauer, welche die Zellen im Medium belassen, und von der Degradationsrate des löslichen VEGFR-1 im Medium abhängig. Die Akkumulation von VEGFR-1 im Medium über 24 h führt bei Normalisierung am Schluss der 24-Stunden-Periode gemessenen Gesamtproteingehalt des zugrunde liegenden Zelllysates im Extremfall zu einer Überschätzung der VEGFR-1-Konzentration im Medium, wenn Zellen absterben (geringere Gesamtproteinmenge, Freisetzung von membranständigem VEGFR-1 ins Medium durch sterbende Zellen), respektive zu einer Unterschätzung

bei Proliferation (höhere Gesamtproteinmenge, geringere Freisetzung von VEGFR-1 ins Medium bei weniger sterbenden Zellen).

Der Vorteil unserer Versuchsanordnung ist, dass die Fähigkeit der normoxischen und hypoxischen Zellen gemessen werden kann, VEGFR-1 in einem bestimmten Zeitraum zu produzieren. Dies ist dann relevant, wenn die Produktion von löslichem VEGFR-1 schnell erfolgen würde und innerhalb von kurzer Zeit, bevor die Zellen nach Wechsel des Mediums und Platzierung in die Hypoxiekammer sich metabolisch an die Hypoxie angepasst haben, bereits ein Grossteil des löslichen VEGFR-1 bereits ins Medium ausgeschieden würde. Unterschiede in der Expression von löslichem VEGFR-1 wären unter solchen Bedingungen unter Umständen nicht mehr zu messen. Diese Problematik könnte mit der Durchführung von *pulse chase*-Experimenten umgangen werden⁵².

Zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von HIF-1 α , VEGFR-2 und VEGFR-1 in den Lysaten der drei Zelllinien HUVEC, MCF-7 und T47D wurde jeweils ein Western Blot durchgeführt. Das Western Blot-Signal für VEGFR-1 erscheint in HUVEC und T47D zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h unter Hypoxie etwas schwächer als unter Normoxie. In MCF-7-Zellen konnte kein Unterschied in der Expression unter Hypoxie gezeigt werden.

Um die Menge an sVEGFR-1 im Western blot zu analysieren, wurde eine Immunopräzipitation im Zellkultur-Medium durchgeführt. Aus technischen Gründen (hoher Hintergrund) ist die Interpretation aller in dieser Studie gezeigten Daten schwierig. Die Expression von sVEGFR-1 scheint jedoch in HUVEC und MCF-7-Zellen unter Hypoxie abzunehmen.

Als Kontrolle diente die Expression von VEGFR-2 mittels Western Blot. Dieser Rezeptor konnte nur in HUVEC nachgewiesen werden, was die bekannte Expression dieses Rezeptors exklusiv auf Endothelzellen bestätigt.

Interessanterweise verschwand das Signal unter Hypoxie bereits nach 24 h. HIF-1 α diente zur internen Kontrolle der Hypoxiebedingungen in vorliegender Arbeit. Bereits nach 24 h Hypoxie war in allen getesteten Zelllinien HIF-1 α nachweisbar.

Um das Wachstumsverhalten der getesteten Zelllinie unter Normoxie und Hypoxie zu bestimmen, wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h gezählt. Parallel dazu wurden die Zellen mit dem Letalfarbstoff Trypanblau gefärbt.

Generell kann gesagt werden, dass bei HUVEC kein Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie zu messen war. Das ist von besonderem Interesse, weil gezeigt werden konnte, dass unter Hypoxie das Zellwachstum stagniert. Hypoxie scheint einen Einfluss auf das Zellwachstum unabhängig von der Induktion des Zelltodes zu haben. MCF-7 Zellen reagieren äusserst sensitiv auf 0,1% Hypoxie. Zum einen stagniert das Wachstum und zum anderen steigt der Anteil der trypanpositiven Zellen auf 25% der Gesamtpopulation an. T47D-Zellen stellten im Vergleich zu HUVEC und MCF-7 unter Hypoxie das Wachstum zeitverzögert ein. Im Allgemeinen lag der Anteil trypanpositiver Zellen unter denen von MCF-7 und HUVEC.

Ein weiterer Aspekt betrifft die statistische Auswertbarkeit der Ergebnisse. Es wurden sowohl parametrische als auch nicht-parametrische Tests zur Berechnung der Signifikanz (p) von Unterschieden zwischen den Gruppen (ungepaarte Daten) herangezogen (ANOVA, resp. Kruskal Wallis-Test für den Vergleich von mehreren Gruppen miteinander, und T Test, resp. Mann Whitney-U-Test für den Vergleich zwischen zwei Gruppen). Es werden immer wieder Diskussionen darüber geführt, ob es sinnvoll ist, oder überhaupt möglich, Signifikanztests bei Stichprobenzahlen < 4 durchzuführen. Einerseits wäre es wünschenswert, Experimente mit einer für statistische Auswertungen genügend grossen Stichprobenanzahl durchzuführen. Dem stehen Hindernisse bei der logistischen Bewältigung von grossen experimentellen Ansätzen, sowie im zeitlichen und finanziellen Aufwand gegenüber.

Das Problem besteht einerseits darin, dass bei kleinen Stichprobenzahlen Standardabweichung (und Standardfehler) systematisch unterschätzt werden. Die Unterschätzung beträgt rund 25% bei einer Stichprobenzahl $n=2$, aber bloss 5% bei $n=6$. Gurland und Tripathi haben 1971 Methoden zur Korrektur dieses Effektes vorgeschlagen (siehe Sokal und Rohlf⁵³ für eine Gleichung, welche einen Korrekturfaktor für kleine Stichprobenzahlen enthält). Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Anwendung von nicht-parametrischen Tests bei einer Stichprobenzahl von <4 aus mathematischen Gründen kein signifikantes Ergebnis mehr geben kann. Bland und Altman haben in zwei kürzlich erschienenen Arbeiten darauf hingewiesen, dass die vermeintlich allgemeingültige Ansicht, dass sich kleine Stichprobenzahlen a priori einer statistischen Beurteilung entziehen müssen, nicht korrekt ist. Sie befürworten die Verwendung von parametrischen Tests (welche aus mathematischer Sicht auch Signifikanzen aus Stichprobenzahlen <4 berechnen können), wenn die Erfahrung mit der Analyse eines Parameters zeigt, dass diese bei grossen Stichprobenzahlen normalverteilt sind^{54,55}. Aus experimenteller Sicht ist es wohl vernünftig anzunehmen, dass kein biologisch relevanter Mechanismus vermutet werden kann, wenn ein Experiment bei dreimaliger exakt gleichartiger Wiederholung weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene konsistente Resultate liefert. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann zusammengefasst werden, dass die Hypoxie als alleiniger Faktor die Expression von VEGFR-1 in kultivierten Endothel- und Brustkrebszellen nicht wesentlich beeinflusst. Zusätzliche Experimente könnten zeigen, ob aus einer noch längeren Inkubationszeit, einer noch extremeren Hypoxie (bis hin zur Anoxie), oder aus dem fehlenden Mediumswechsel (mit konsekutivem Anstieg der VEGF-Konzentration) eine Regulation von VEGFR-1 resultiert.

7 Referenzen

- 1 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; **100**: 57-70.
- 2 De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*. 2003; **200**: 429-47.
- 3 Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat. Rev. Cancer*. 2002; **2**: 826-35.
- 4 Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med*. 1995; **1**: 149-53.
- 5 Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med*. 2003; **9**: 653-60.
- 6 Zweifel M, Ruegg C. Tumorangiogenese-Hemmung in der onkologischen Therapie: Heutiger Stand und offene Fragen. *Schweizer Zeitschrift für Onkologie* 2006; **2**: 2-5.
- 7 Miao HQ, Lee P, Lin H, Soker S, Klagsbrun M. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J*. 2000; **14**: 2532-9.
- 8 Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis*. 2006; **9**: 225-30.
- 9 Fan F, Wey JS, McCarty MF *et al*. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* 2005; **24**: 2647-53.

- 10 Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int. J Biochem. Cell Biol.* 2001; **33**: 409-20.
- 11 Chen H, Ikeda U, Shimpo M *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by transfection with the soluble FLT-1 gene. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 2000; **36**: 498-502.
- 12 Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1993; **90**: 10705-9.
- 13 Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; **87**: 3336-43.
- 14 Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ. Res.* 2004; **95**: 884-91.
- 15 Ambati BK, Nozaki M, Singh N *et al.* Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature.* 2006; **443**: 993-7.
- 16 Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A *et al.* Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; **5**: 519-24.
- 17 Zaman K, Driscoll R, Hahn D *et al.* Monitoring multiple angiogenesis-related molecules in the blood of cancer patients shows a correlation between VEGF-A and MMP-9 levels before treatment and divergent changes after surgical vs. conservative therapy. *Int. J Cancer.* 2006; **118**: 755-64.

- 18 Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001; **93**: 266-76.
- 19 Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 1997; **272**: 23659-67.
- 20 Zweifel M, Driscoll R, Ruegg C. Differential expression of soluble and transmembrane VEGF Receptor-1 under hypoxia and acidic pH in endothelial cells. *AACR Meeting Abstracts* 2006; **2006**: 440.
- 21 Schlaepfer DD, Broome MA, Hunter T. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol. Cell Biol.* 1997; **17**: 1702-13.
- 22 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; **86**: 353-64.
- 23 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 2003; **9**: 669-76.
- 24 Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995; **376**: 66-70.
- 25 Autiero M, Waltenberger J, Communi D *et al.* Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 2003; **9**: 936-43.

- 26 Hauser S, Weich HA. A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors*. 1993; **9**: 259-68.
- 27 Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991; **88**: 9267-71.
- 28 Graeven U, Fiedler W, Karpinski S *et al.* Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* 1999; **125**: 621-9.
- 29 Inoue T, Kibata K, Suzuki M, Nakamura S, Motoda R, Orita K. Identification of a vascular endothelial growth factor (VEGF) antagonist, sFlt-1, from a human hematopoietic cell line NALM-16. *FEBS Lett.* 2000; **469**: 14-8.
- 30 Weigand M, Hantel P, Kreienberg R, Waltenberger J. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. *Angiogenesis*. 2005; **8**: 197-204.
- 31 Pomyje J, Zivny J, Sefc L, Plasilova M, Pytlik R, Necas E. Expression of genes regulating angiogenesis in human circulating hematopoietic cord blood CD34+/CD133+ cells. *Eur. J. Haematol.* 2003; **70**: 143-50.
- 32 De Paulis A, Prevete N, Fiorentino I *et al.* Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J. Immunol.* 2006; **177**: 7322-31.
- 33 Selheim F, Holmsen H, Vassbotn FS. Identification of functional VEGF receptors on human platelets. *FEBS Lett.* 2002; **512**: 107-10.

- 34 Ancelin M, Chollet-Martin S, Herve MA, Legrand C, El Benna J, Perrot-Appianat M. Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. *Lab Invest.* 2004; **84**: 502-12.
- 35 Krysiak O, Bretschneider A, Zhong E *et al.* Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (sFLT-1) Mediates Downregulation of FLT-1 and Prevents Activated Neutrophils From Women With Preeclampsia From Additional Migration by VEGF. *Circ. Res.* 2005; **97**: 1253-61.
- 36 Bruegmann E, Gruemmer R, Neulen J, Motejlek K. Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 secretion from human endothelial cells by tissue inhibitor of metalloproteinase 1. *Mol. Hum. Reprod.* 2009.
- 37 Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J. Biol. Chem.* 2006; **281**: 3604-13.
- 38 Ito TK, Ishii G, Saito S *et al.* Degradation of soluble VEGF receptor-1 by MMP-7 allows VEGF access to endothelial cells. *Blood* 2009; **113**: 2363-9.
- 39 Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G *et al.* Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998; **95**: 8795-800.
- 40 Meyer RD, Mohammadi M, Rahimi N. A single amino acid substitution in the activation loop defines the decoy characteristic of VEGFR-1/FLT-1. *J. Biol. Chem.* 2006; **281**: 867-75.

- 41 Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998; **95**: 9349-54.
- 42 Indraccolo S, Favaro E, Amadori A. Dormant tumors awaken by a short-term angiogenic burst: the spike hypothesis. *Cell Cycle*. 2006; **5**: 1751-5.
- 43 Harach HR, Franssila KO, Wasenius VM. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A "normal" finding in Finland. A systematic autopsy study. *Cancer*. 1985; **56**: 531-8.
- 44 Nielsen M, Thomsen JL, Primdahl S, Dyreborg U, Andersen JA. Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies. *Br. J Cancer*. 1987; **56**: 814-9.
- 45 Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M *et al*. Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology* 2004; **145**: 4838-45.
- 46 Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M, Wenger RH. Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflügers Arch*. 2001; **443**: 240-9.
- 47 Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV *et al*. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol*. 1996; **16**: 4604-13.

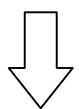
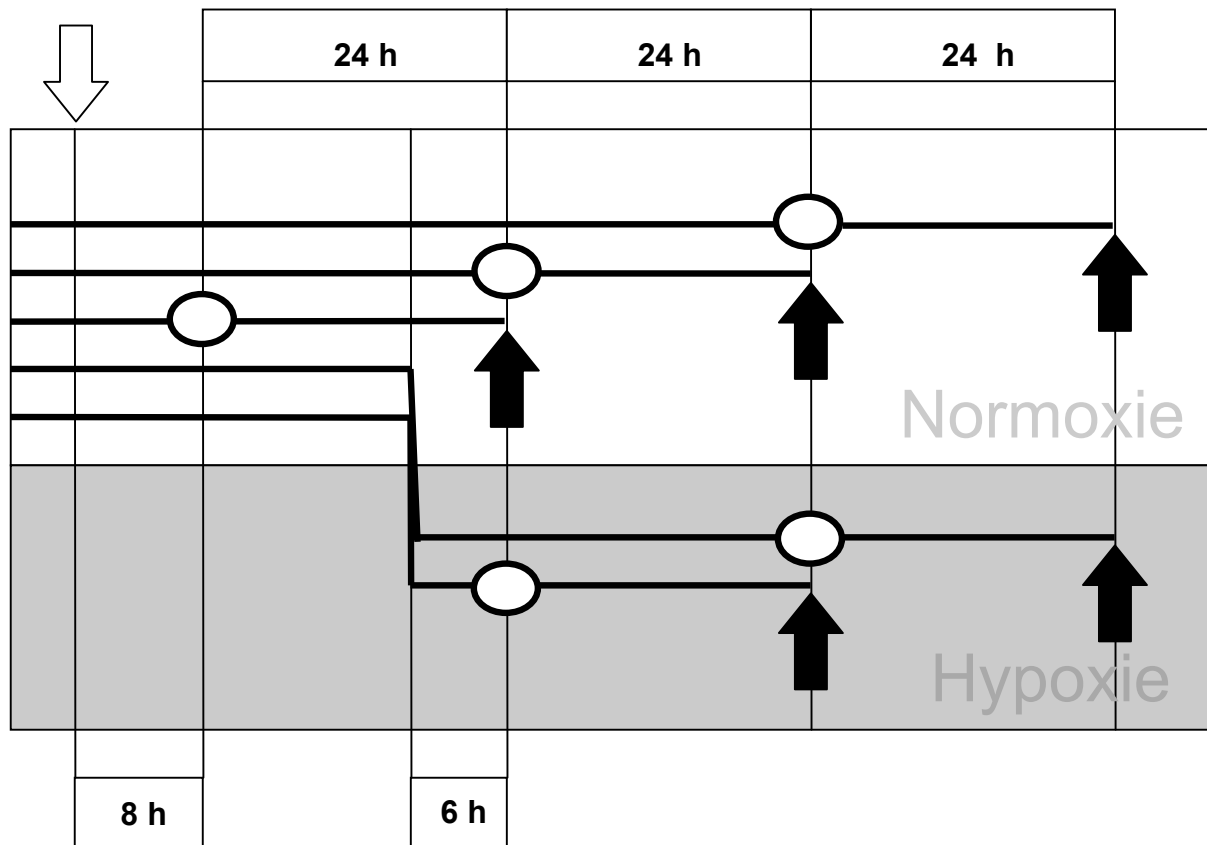
- 48 Yamakawa M, Liu LX, Date T *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ. Res.* 2003; **93**: 664-73.
- 49 Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G, Weindel K, Herzog C, Marme D. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res.* 1997; **57**: 5421-5.
- 50 Suzuki H, Seto K, Shinoda Y *et al.* Paracrine upregulation of VEGF receptor mRNA in endothelial cells by hypoxia-exposed hep G2 cells. *Am. J Physiol.* 1999; **276**: G92-G97.
- 51 Wang D, Donner DB, Warren RS. Homeostatic modulation of cell surface KDR and Flt1 expression and expression of the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) receptor mRNAs by VEGF. *J Biol. Chem.* 2000; **275**: 15905-11.
- 52 Alberts B. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science of Taylor & Francis Books, Inc., 2010.
- 53 Sokal, Rohlf. *Biometry*. 1981; p53.
- 54 Altman DG, Bland JM. Parametric v non-parametric methods for data analysis. *BMJ*. 2009; **338**:a3167.
- 55 Bland JM, Altman DG. Analysis of continuous data from small samples. *BMJ*. 2009; **338**:a3166.

8 Tabellen und Figuren

Tabelle 1. Gesamtzellzahlen und Ergebnisse der Trypanblaufärbung aller getesteten Zelltypen unter Hypoxie (0,1%) und Normoxie zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h.

Zellen pro ml			
HUVEC	trypanpositiv	trypannegativ	Summe
t0	18750	357500	376250
t0 Stdv	13150	97681	110831
t24 N	60000	616250	676250
t24 N Stdv	49160	127369	176529
t24 H	38750	362500	401250
t24 H Stdv	48023	107432	155456
t48 N	88750	535000	623750
t48 N Stdv	37053	279136	316188
t48 H	41250	222500	263750
t48 H Stdv	27801	152998	180799
MCF-7	trypanpositiv	trypannegativ	Summe
t0	106667	1573333	1680000
t0 Stdv	72858	513233	586092
t24 N	396250	2203750	2600000
t24 N Stdv	477866	833830	1311697
t24 H	480000	1406250	1886250
t24 H Stdv	270031	77392	347423
t48 N	602500	3592500	4195000
t48 N Stdv	389626	353400	743026
t48 H	250000	723750	973750
t48 H Stdv	156418	402438	558856
T47D	trypanpositiv	trypannegativ	Summe
t0	41250	1472500	1513750
t0 Stdv	12500	786474	798974
t24 N	128750	2655000	2783750
t24 N Stdv	29545	1009001	1038546
t24 H	111250	2386250	2497500
t24 H Stdv	58363	1157831	1216194
t48 N	122500	4003750	4126250
t48 N Stdv	16583	591416	607999
t48 H	72500	650000	722500
t48 H Stdv	31820	750955	782775

Figur 5. Schematische Anordnung der Zellkulturbedingungen inklusive Messzeitpunkte.



Ausplattieren

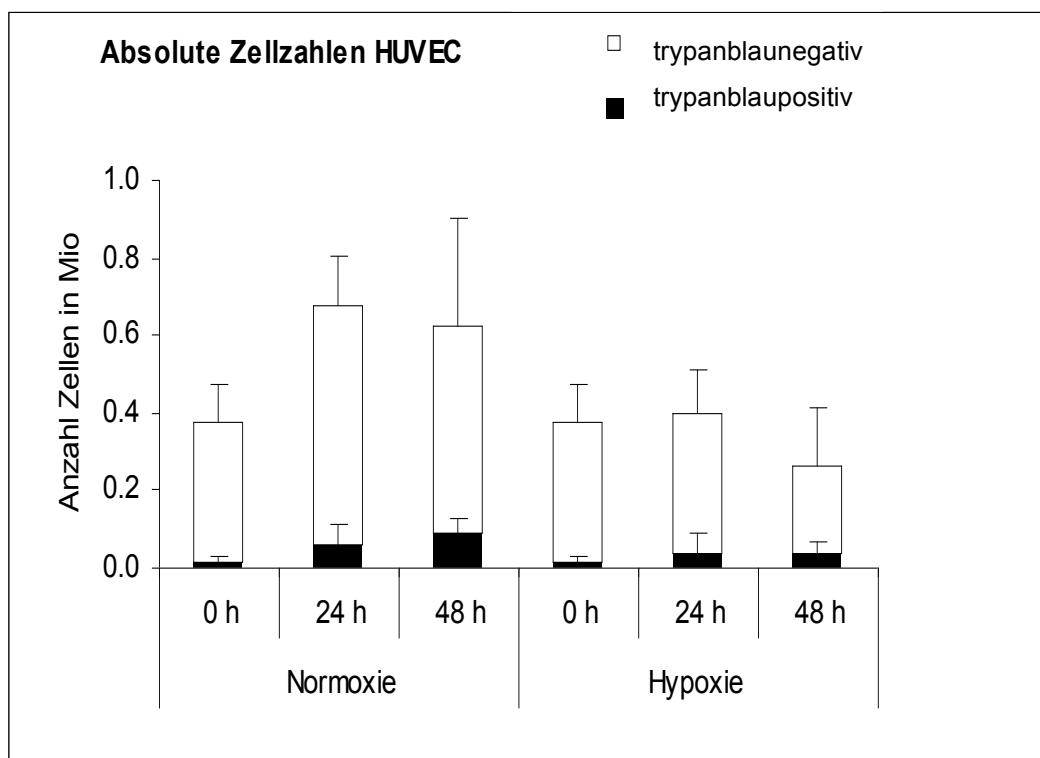


Mediumwechsel

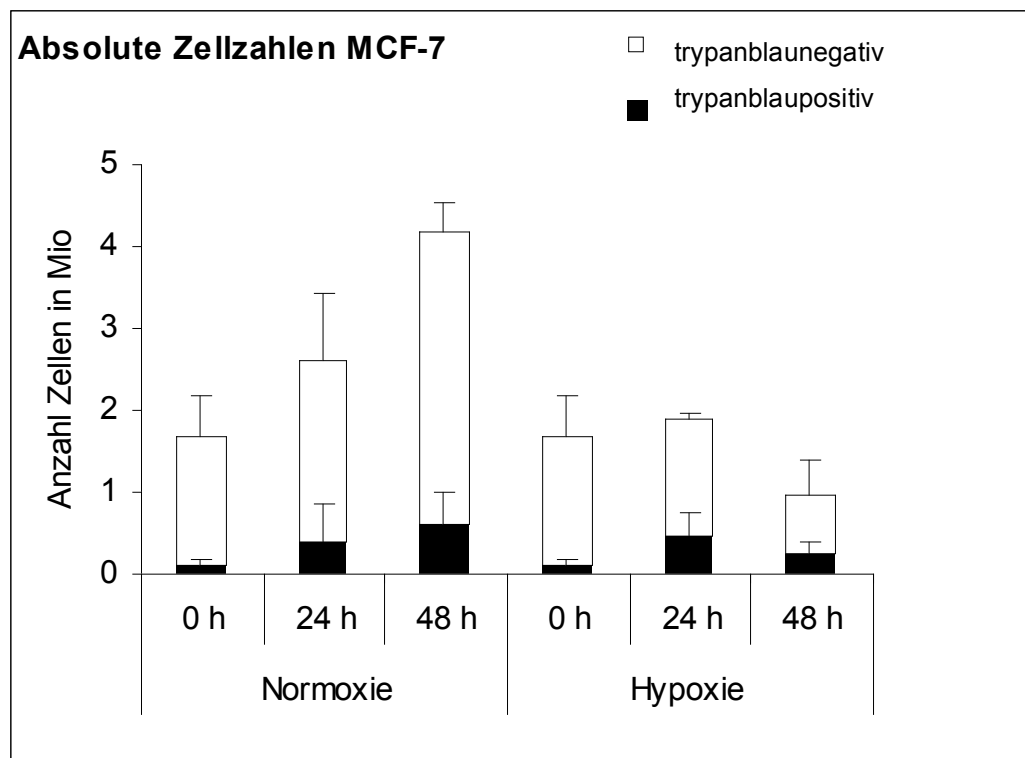


Ernte

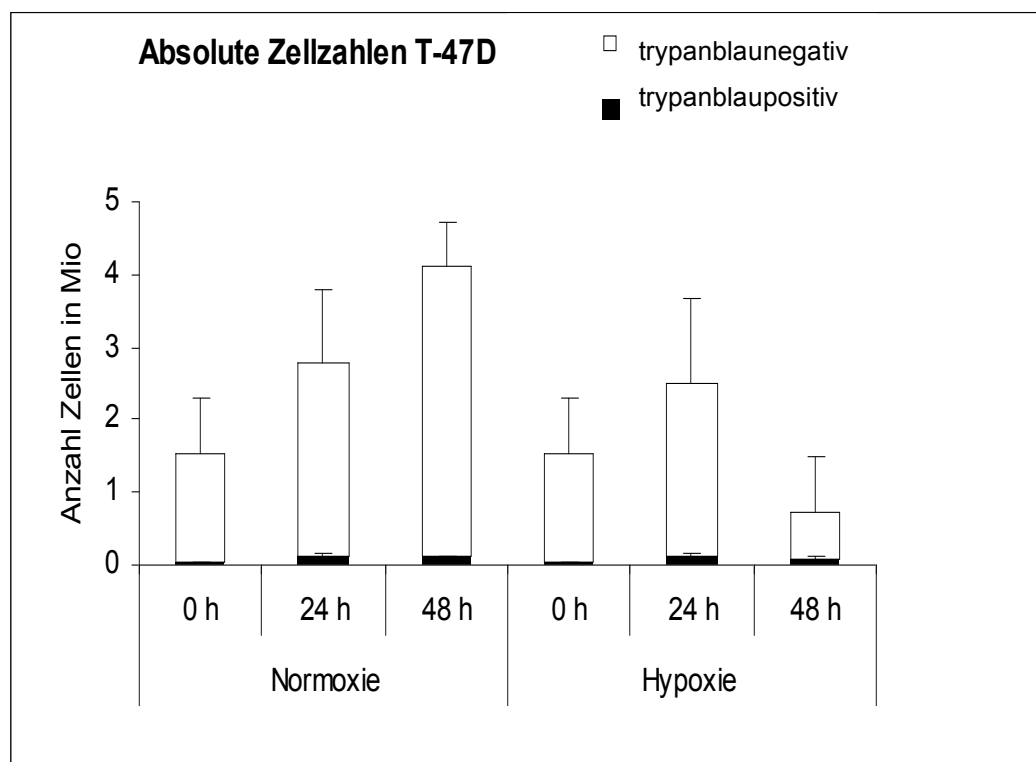
Figur 6. Trypanblaufärbung von HUVEC unter norm- und hypoxischen Bedingungen.



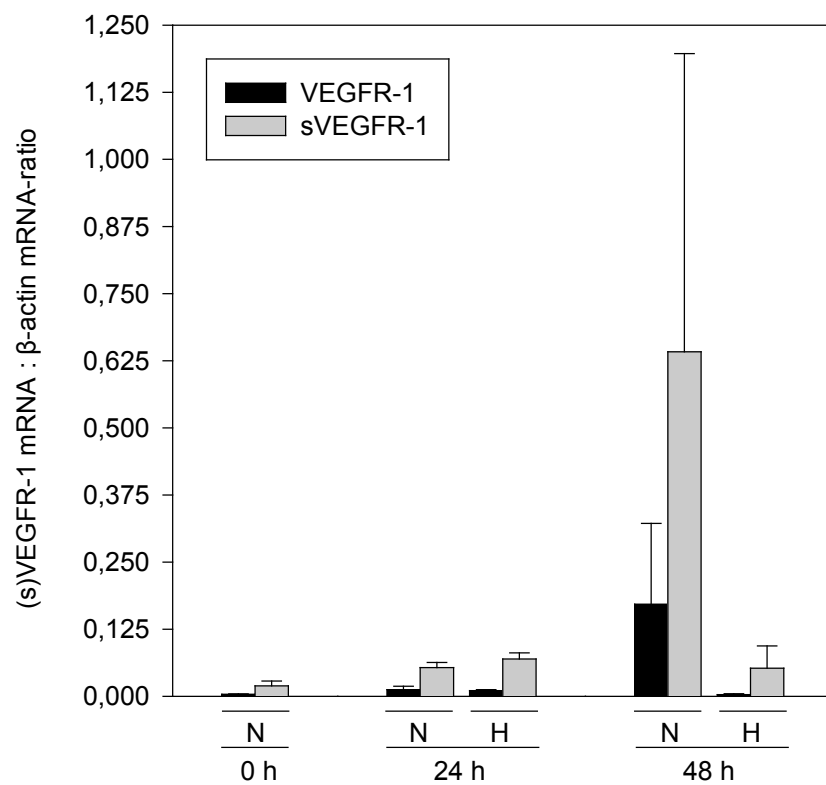
Figur 7. Trypanblaufärbung von MCF-7 Zellen unter norm- und hypoxischen Bedingungen.



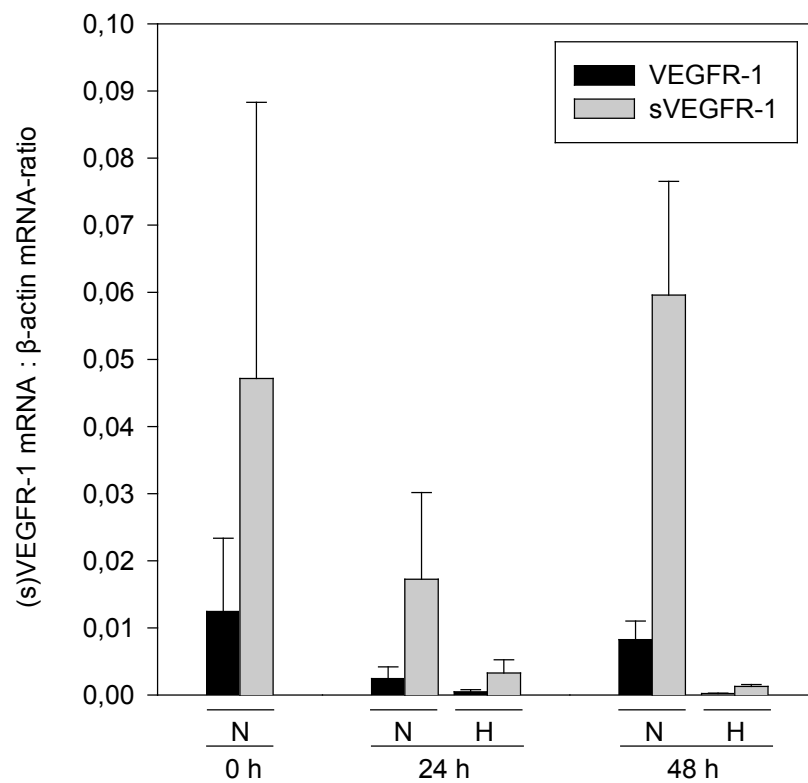
Figur 8. Trypanblaufärbung von T47D-Zellen unter norm- und hypoxischen Bedingungen.



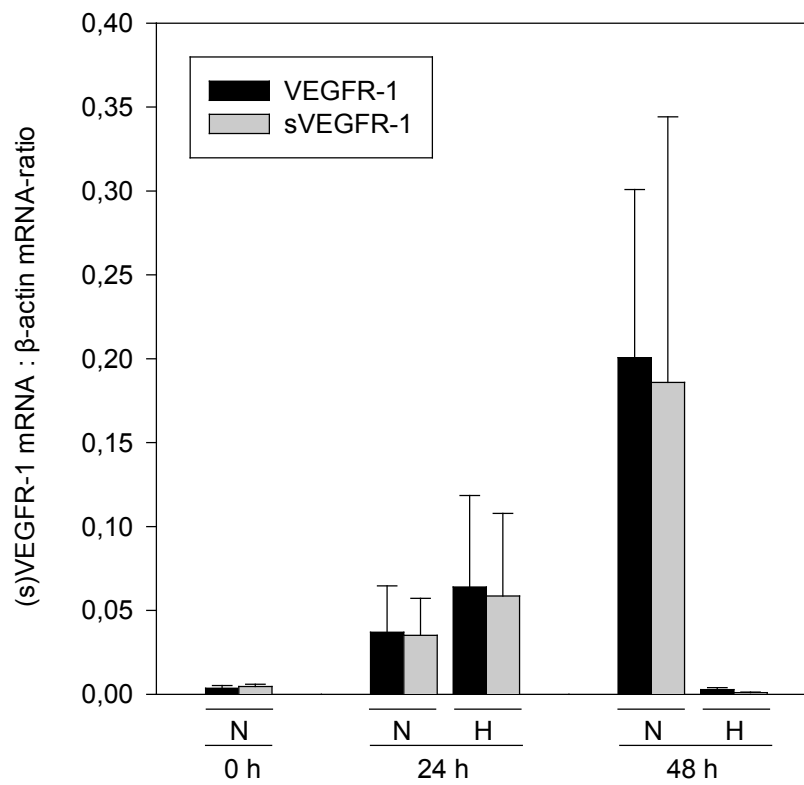
Figur 9. VEGFR-1 mRNA und sVEGFR-1 mRNA in HUVEC unter Normoxie und Hypoxie (0,1%) zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h.



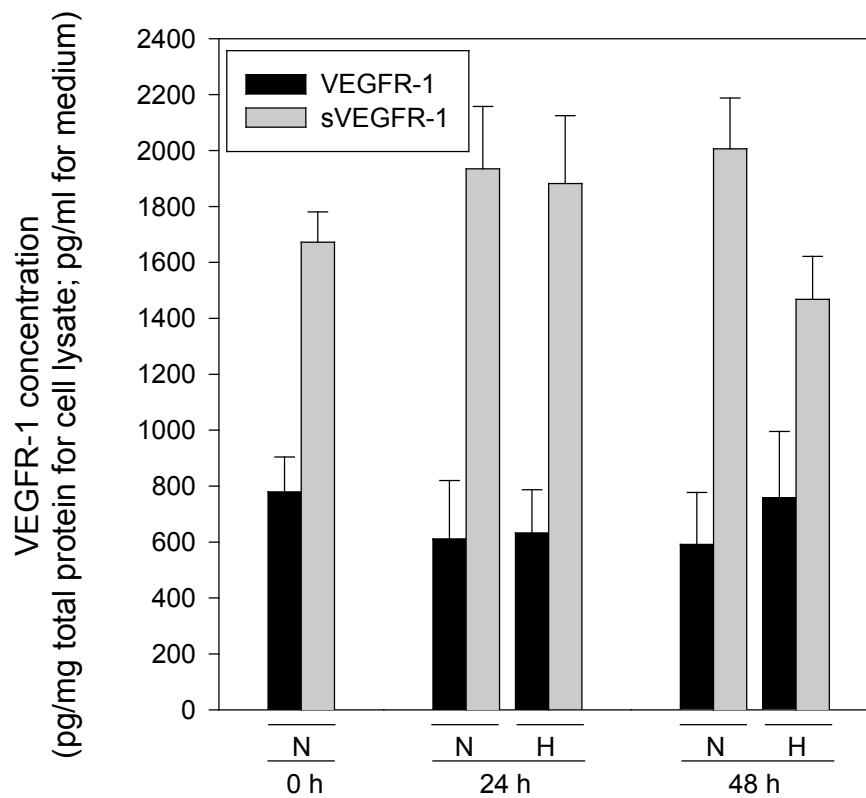
Figur 10. VEGFR-1 mRNA und sVEGFR-1 mRNA in MCF-7 Zellen unter Normoxie und Hypoxie (0,1%) zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h.



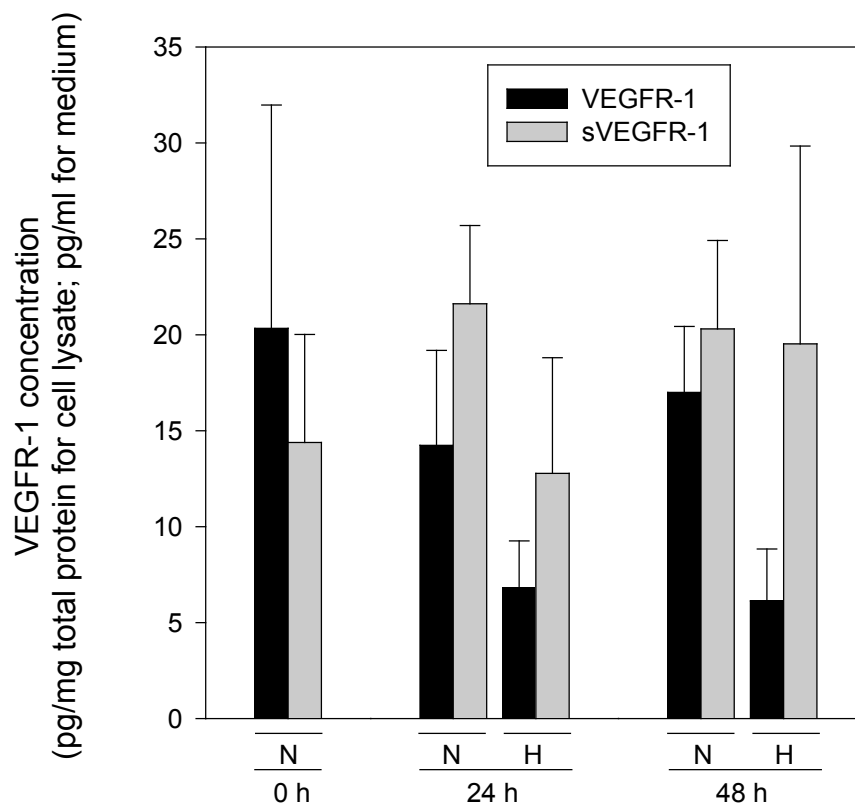
Figur 11 VEGFR-1 mRNA und sVEGFR-1 mRNA in T47D Zellen unter Normoxie und Hypoxie (0,1%) zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h.



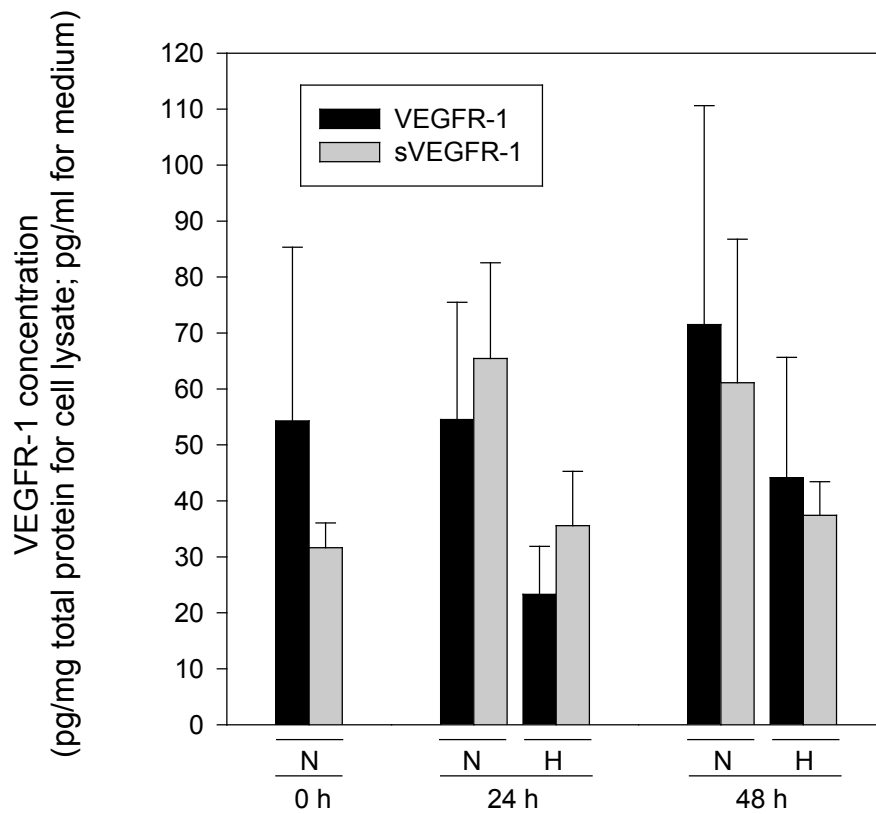
Figur 12. VEGFR-1 und sVEGFR-1 in HUVEC Zelllysaten (VEGFR-1) bzw. Zellkultur-Überständen (sVEGFR-1) unter Normoxie und Hypoxie (0,1%) zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h, bestimmt mittels ELISA.



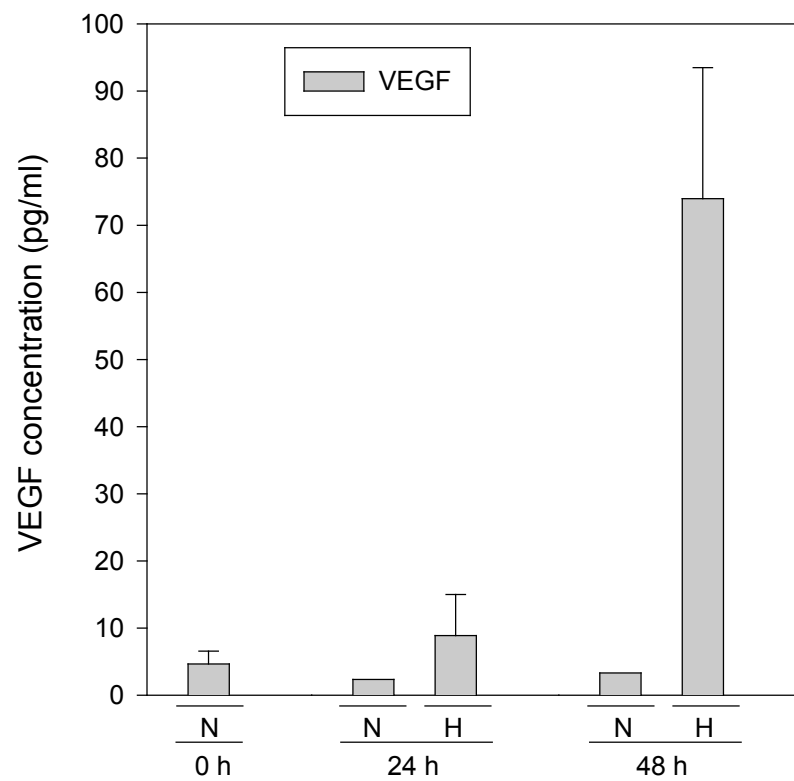
Figur 13. VEGFR-1 und sVEGFR-1 in MCF-7 Zelllysaten (VEGFR-1) bzw. Zellkultur-Überständen (sVEGFR-1) unter Normoxie und Hypoxie (0,1%) zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h, bestimmt mittels ELISA.



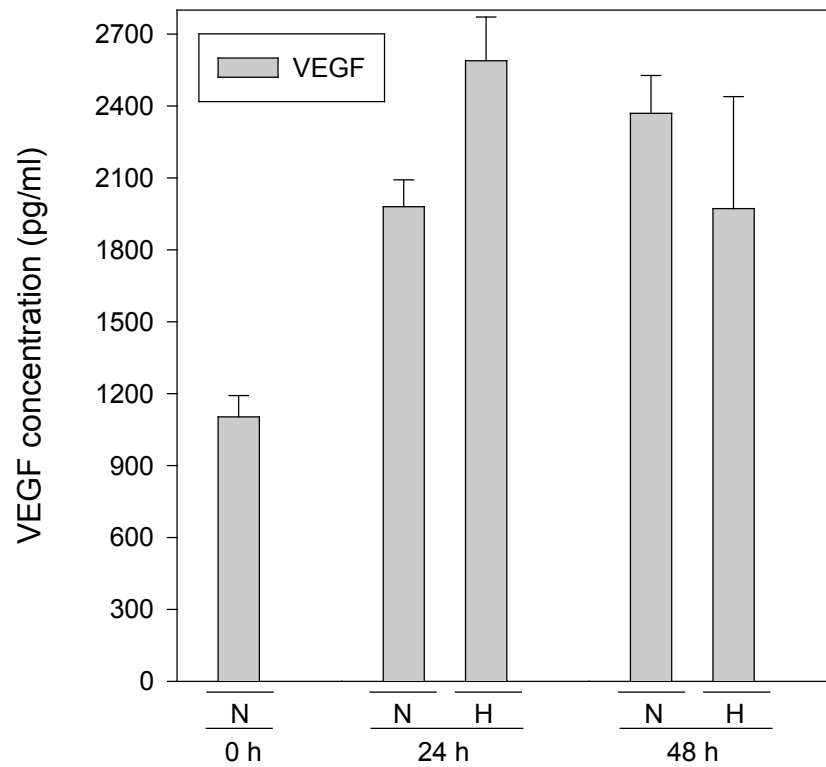
Figur 14. VEGFR-1 und sVEGFR-1 in T47D-Zelllysaten (VEGFR-1) bzw. Zellkulturüberständen (sVEGFR-1) unter Normoxie und Hypoxie (0,1%) zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h, bestimmt mittels ELISA.



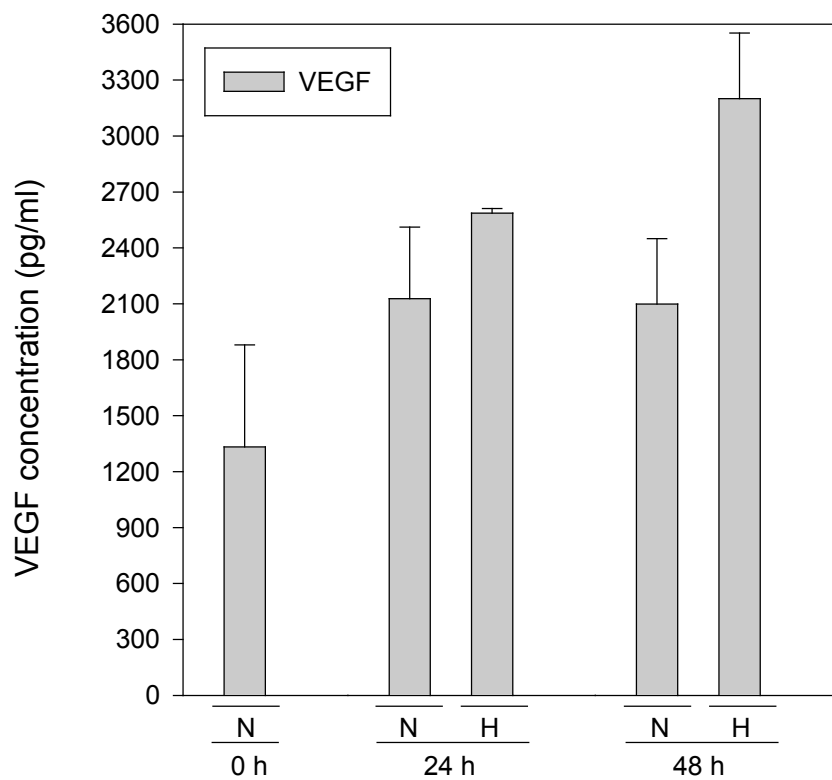
Figur 15. VEGF in HUVEC-Zellkulturüberständen unter Normoxie und Hypoxie (0,1%) zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h, bestimmt mittels ELISA.



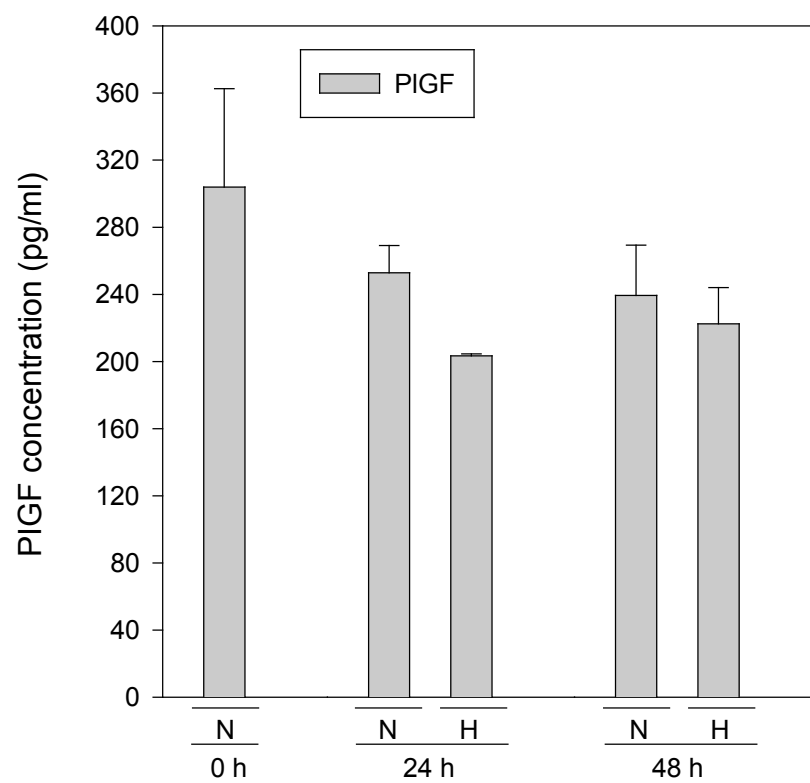
Figur 16. Absolute Menge an VEGF in MCF-7-Zellkulturüberständen unter Normoxie und Hypoxie (0,1%) zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h, bestimmt mittels ELISA.



Figur 17. VEGF in T47D-Zellkulturüberständen unter Normoxie und Hypoxie (0,1%) zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h bestimmt mittels ELISA.

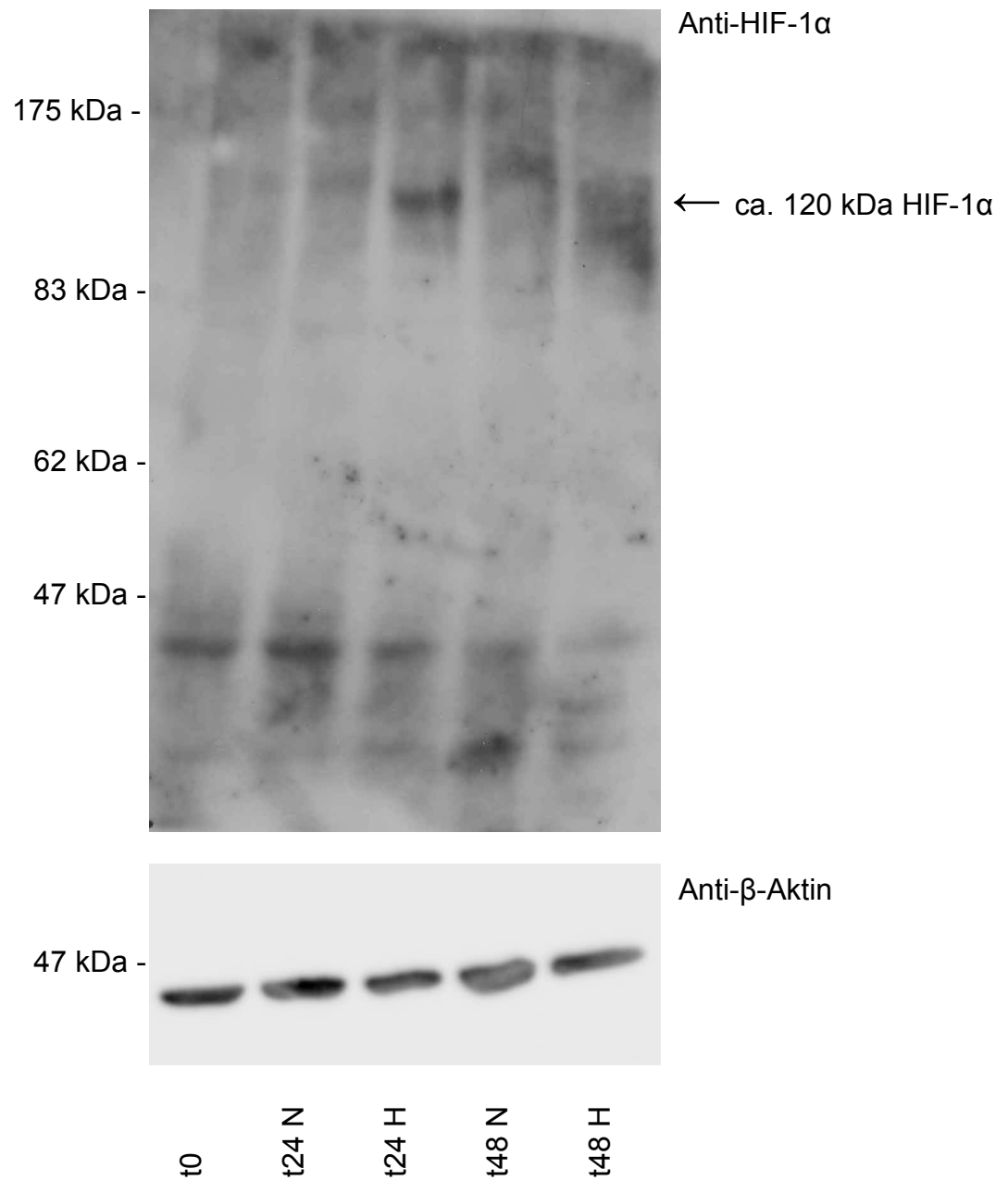


Figur 18. PIGF in HUVEC-Zellkulturüberständen unter Normoxie und Hypoxie (0,1%) zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h, bestimmt mittels ELISA.

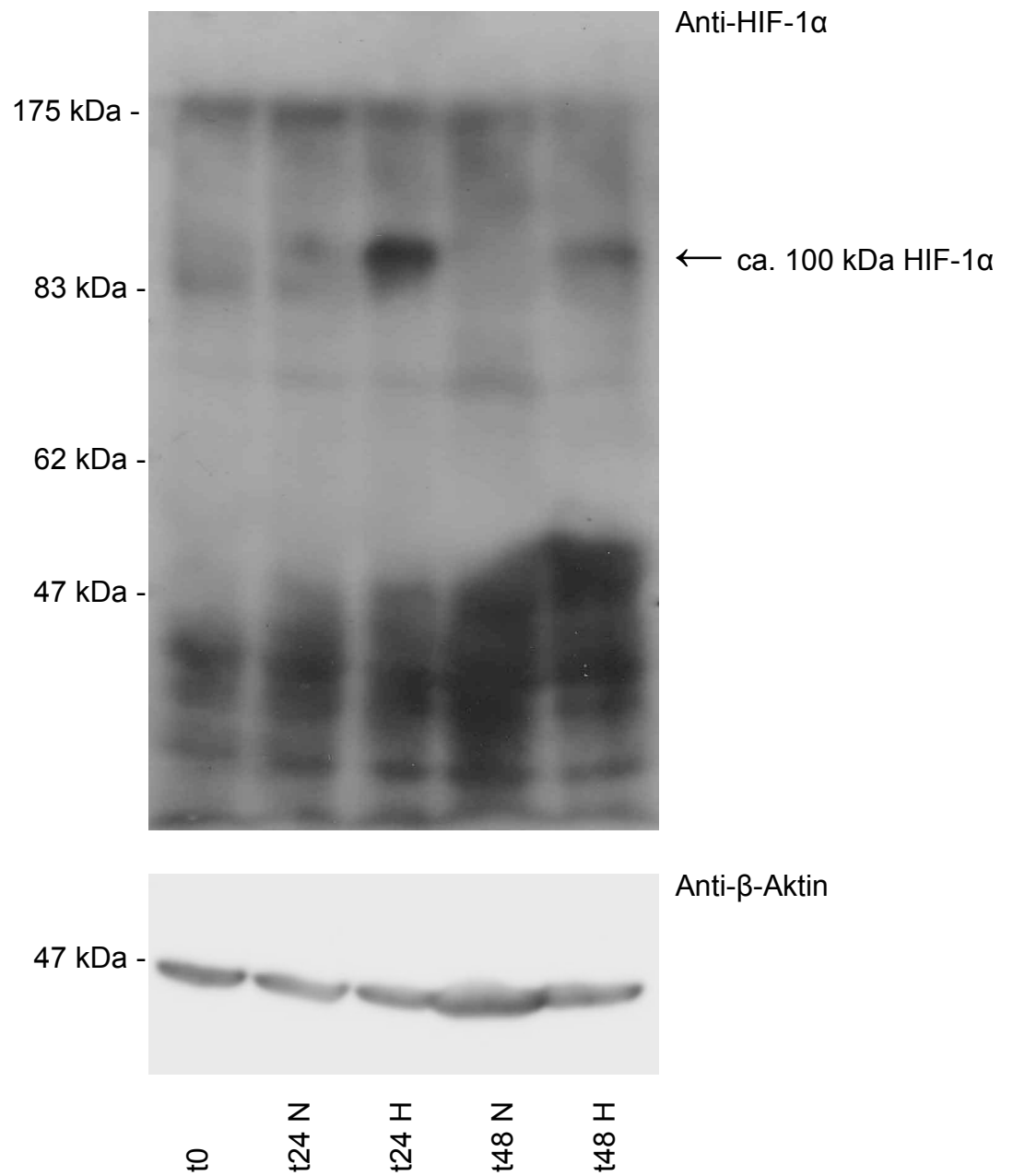


9 Western Blot Resultate

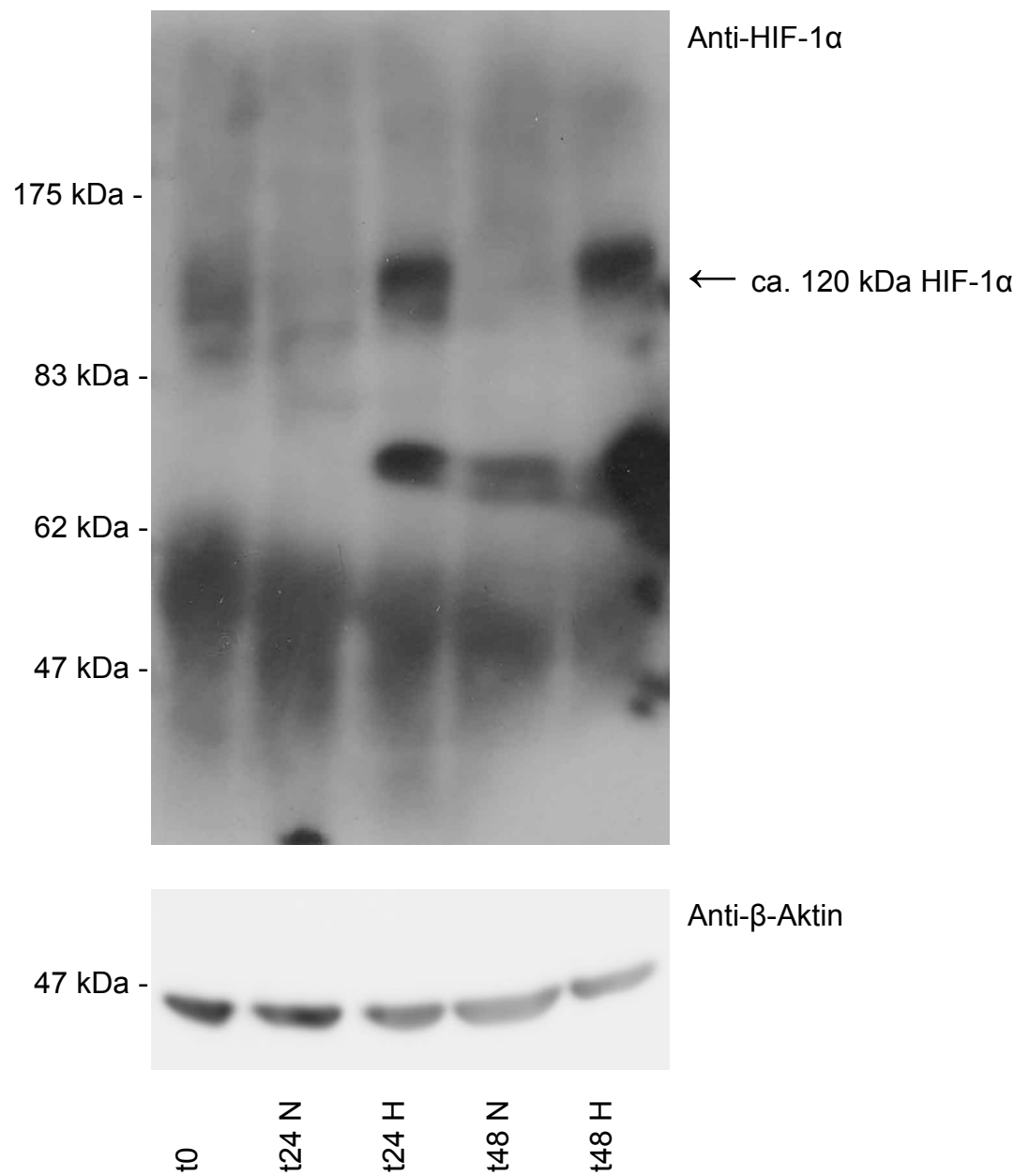
Western blot für HIF-1 α aus HUVEC



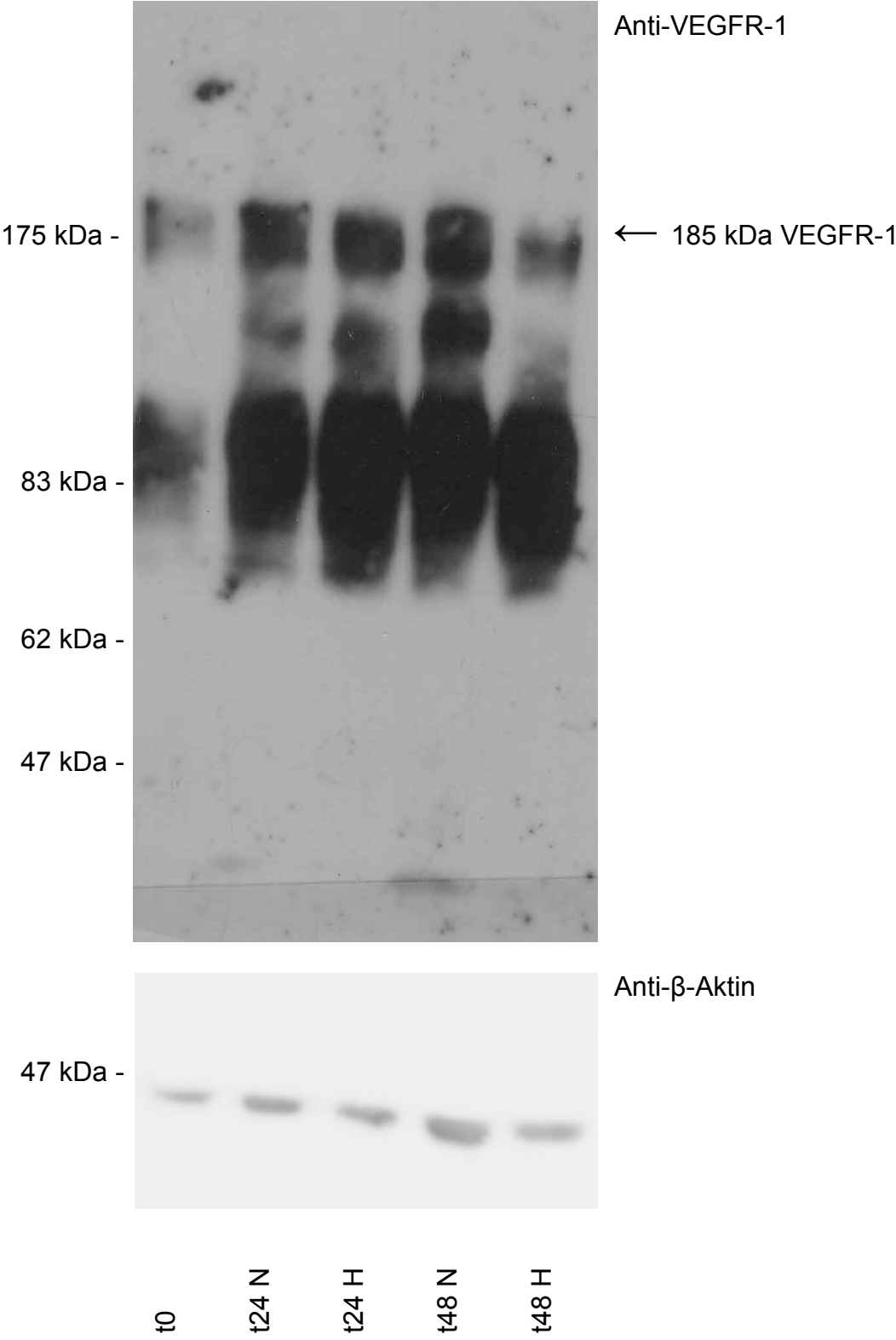
Western blot für HIF-1 α aus MCF-7



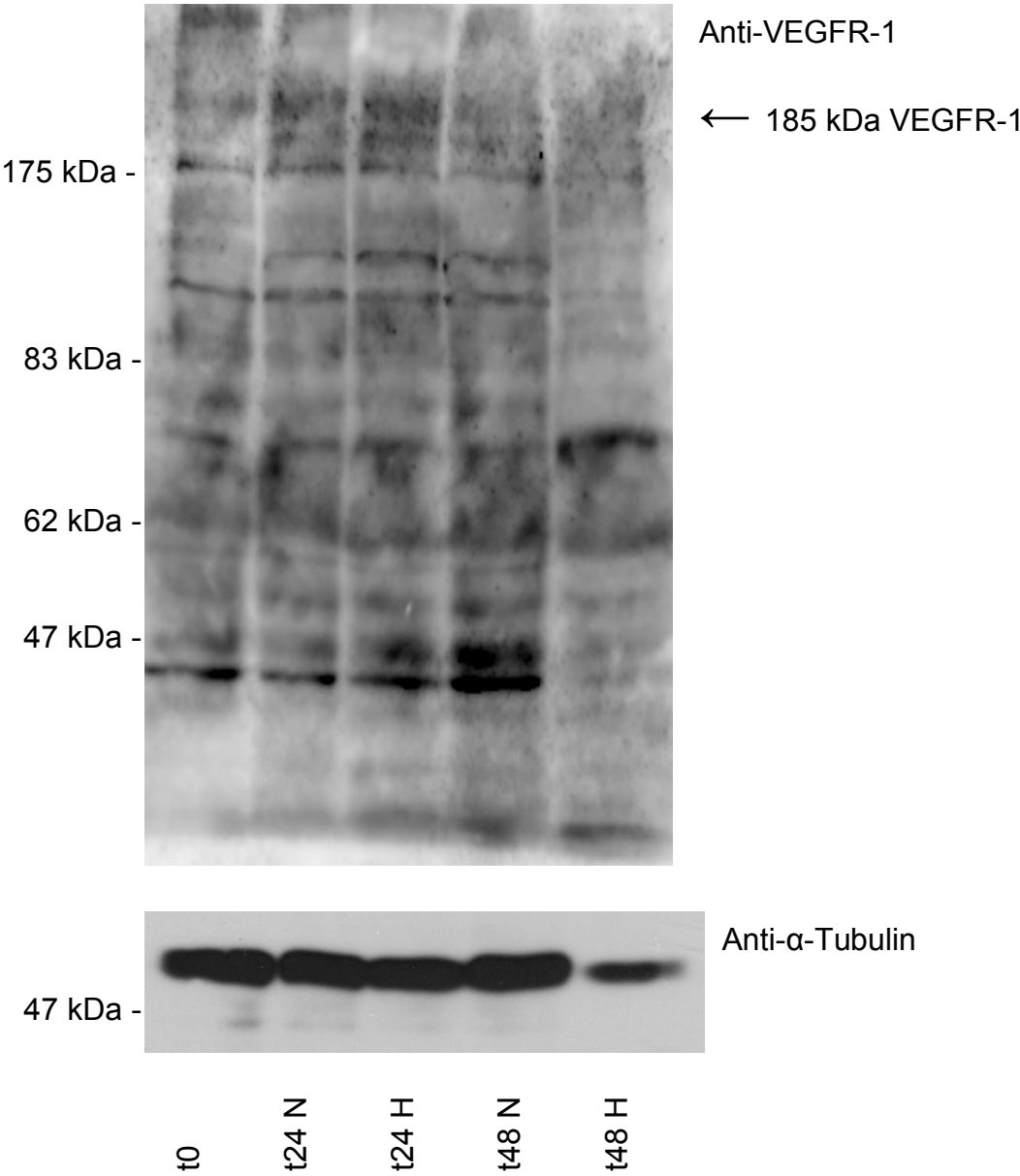
Western blot für HIF-1 α aus T47D



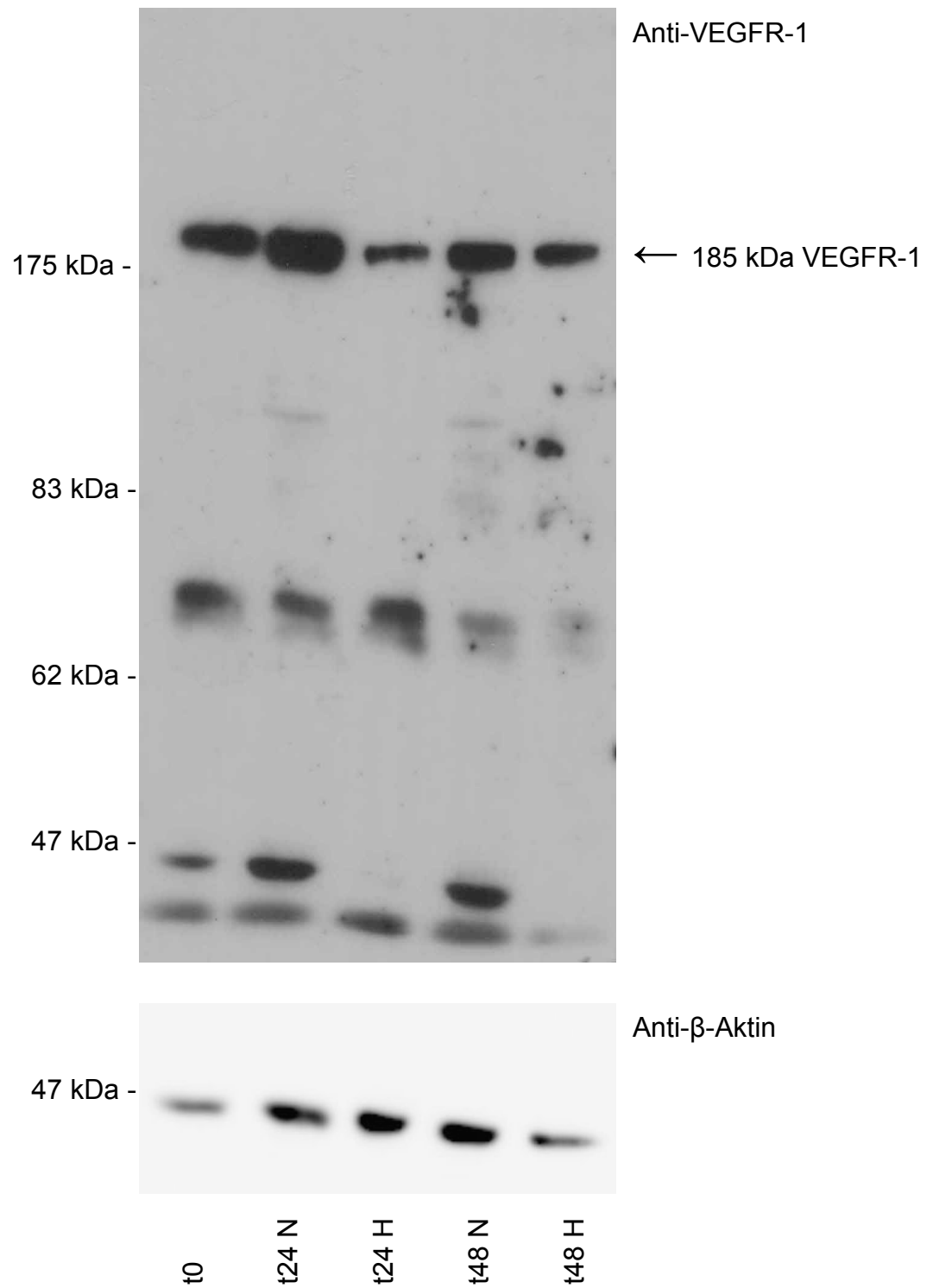
Western blot für VEGFR-1 aus HUVEC



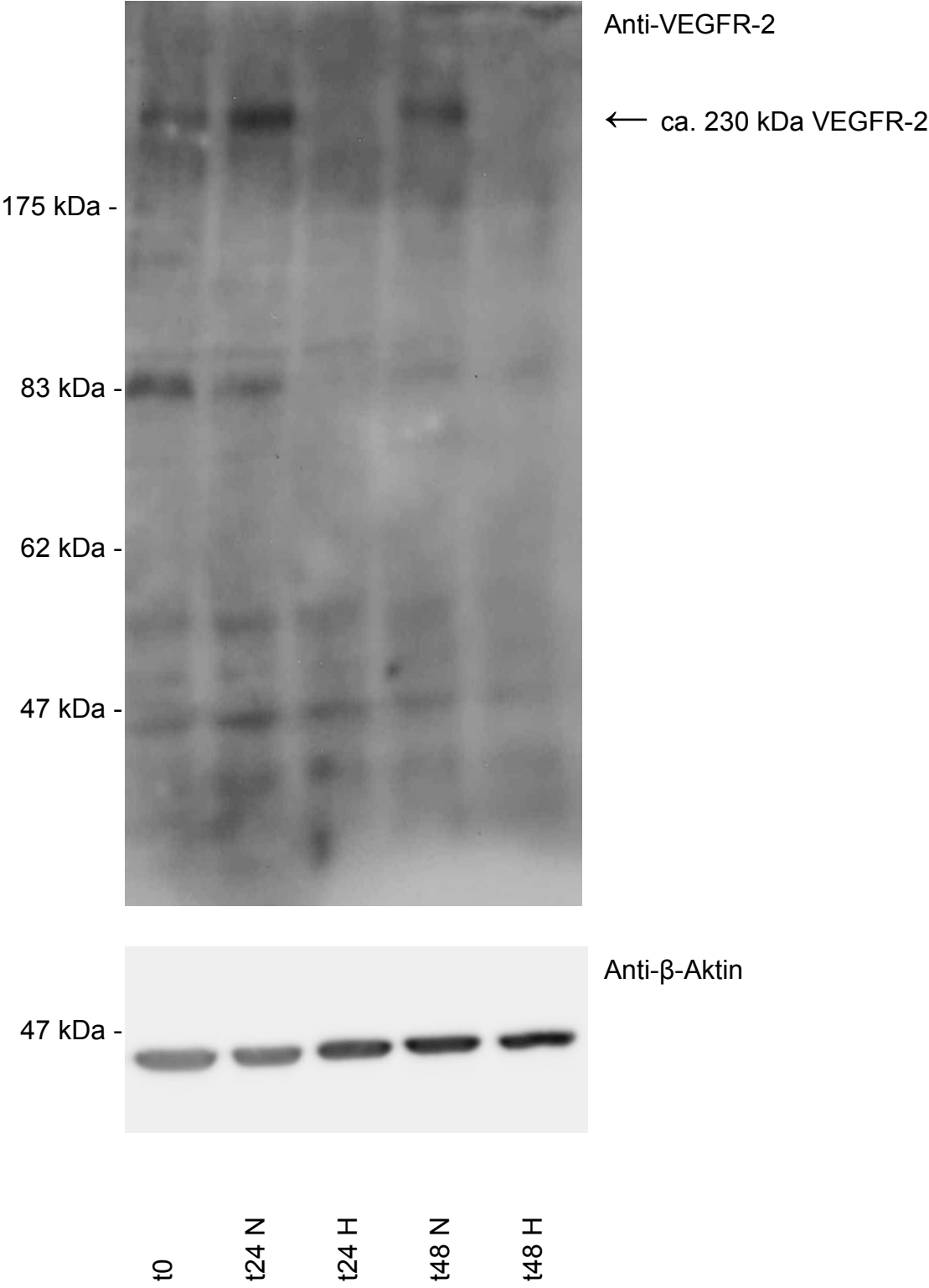
Western blot für VEGFR-1 aus MCF-7



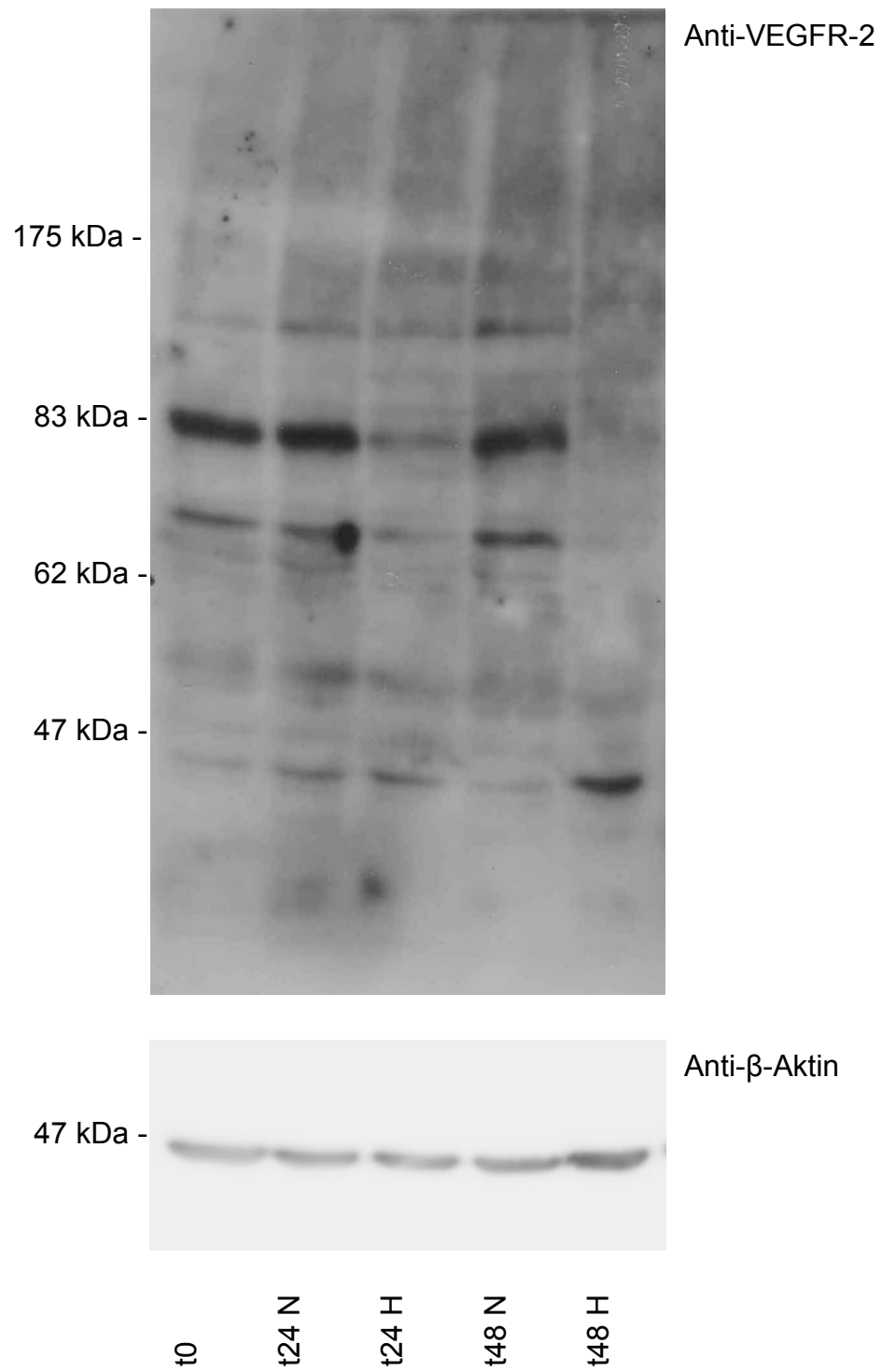
Western blot für VEGFR-1 aus T47D



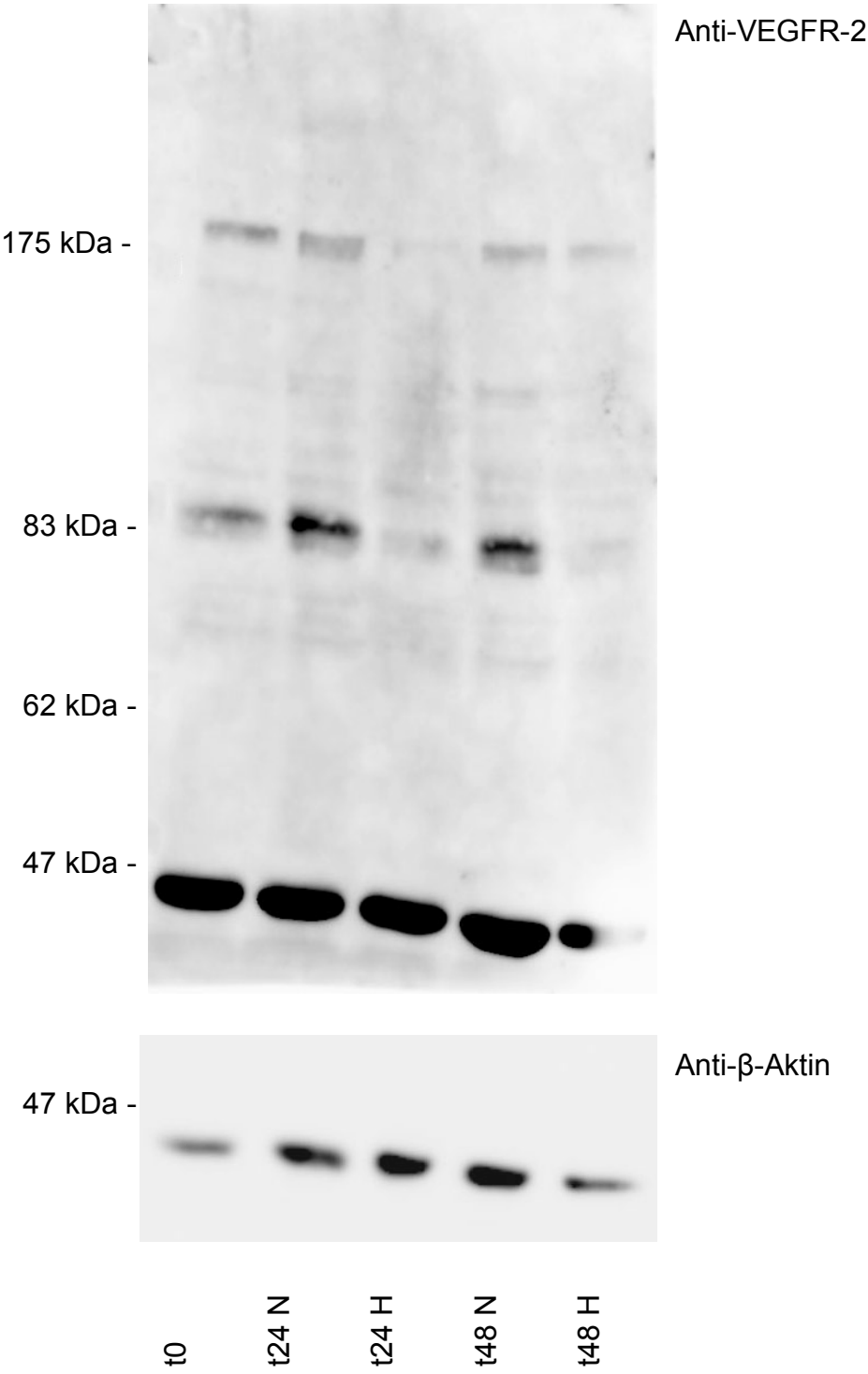
Western blot für VEGFR-2 aus HUVEC



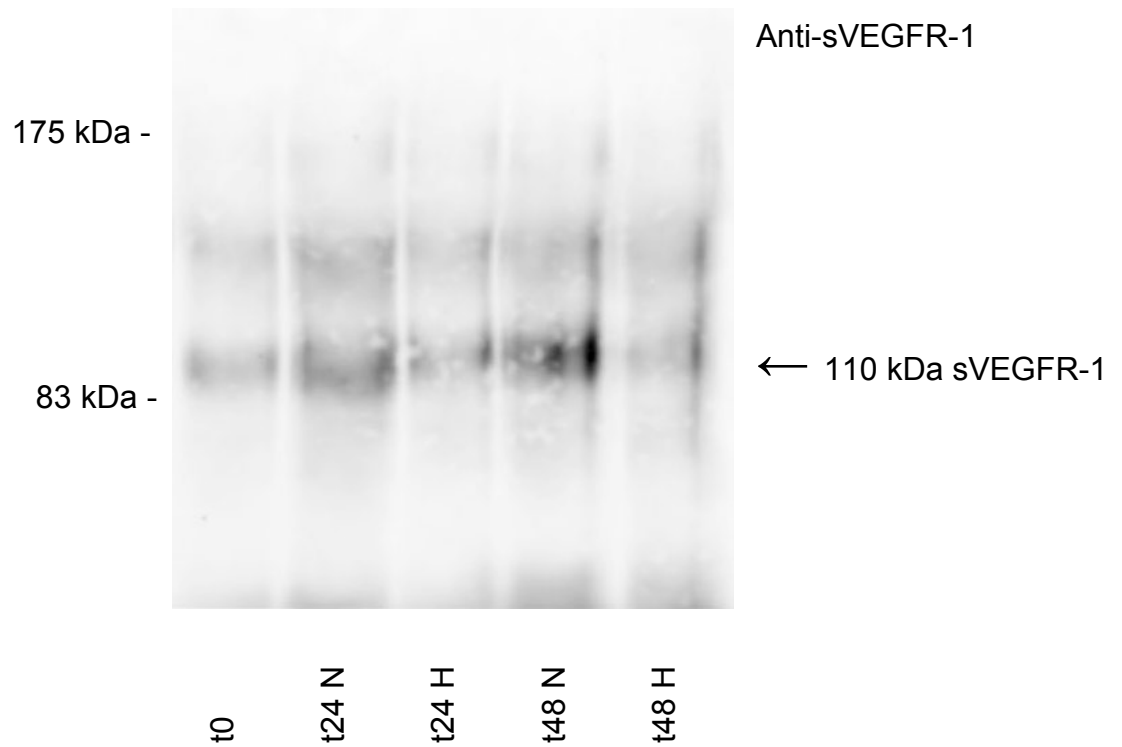
Western blot für VEGFR-2 aus MCF-7



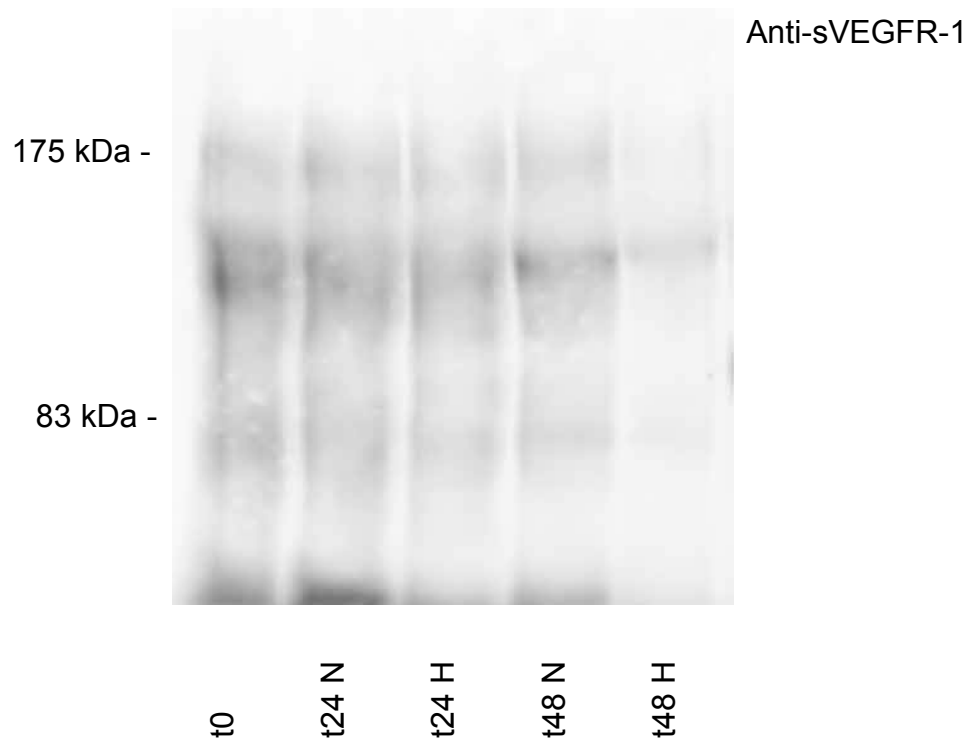
Western blot für VEGFR-2 aus T47D



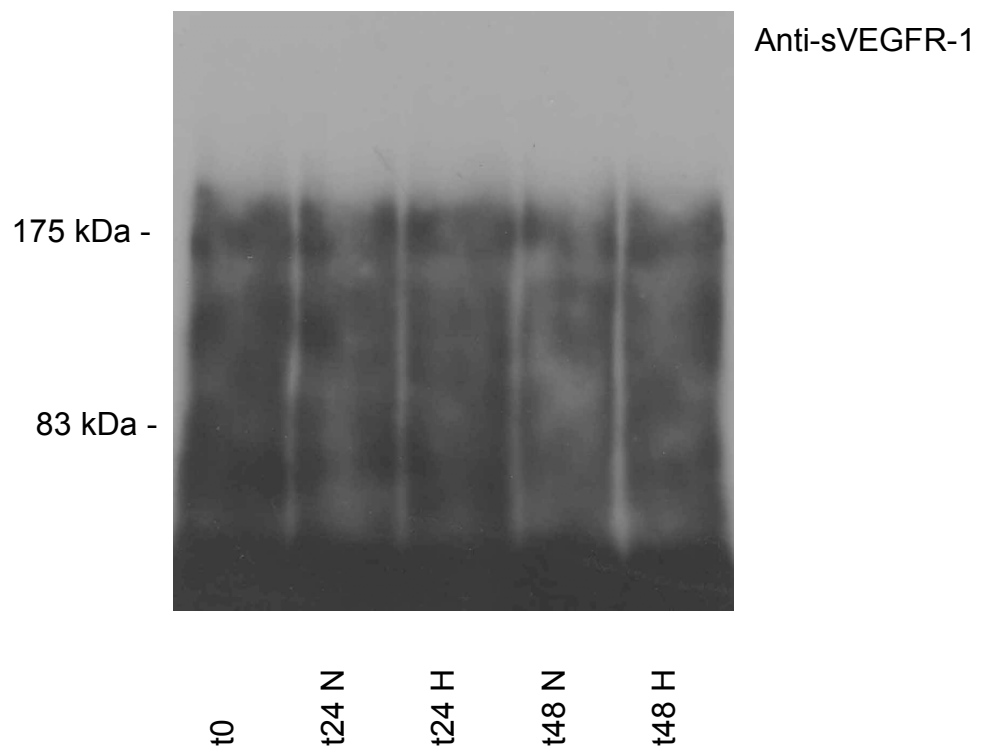
Immunopräzipitation für sVEGFR-1 aus HUVEC (Medium)



Immunopräzipitation für sVEGFR-1 aus MCF-7 (Medium)



Immunopräzipitation für sVEGFR-1 aus T47D (Medium)



10 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt dem ärztlichen Leiter dieser Studie, Herrn Dr. med. Dr. phil. Martin Zweifel. Er hat mich in die wissenschaftliche Tätigkeit eingeführt und hat mit seinen klaren Vorgaben sowie seiner tatkräftigen Unterstützung diese Arbeit massgeblich gefördert.

Prof. Dr. phil. nat. Roland H. Wenger danke ich herzlich für die geduldige Durchsicht dieser Arbeit.

Die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Labors ermöglichten mir die Mitbenutzung der nötigen Infrastruktur und unterstützten mich mit Rat und Tat bei praktischen und theoretischen Problemen. Dafür danke ich herzlich.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mich stets hilfsbereit, verständnisvoll und ermutigend begleitet haben.

11 Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name	Christoph Müller
Adresse	Idaplatz 2 8003 Zürich
Geburtsdatum	10. Februar 1978
Nationalität	CH, Bürger von Stein AR

Medizinische Aus- und Weiterbildung

seit 2009	Assistenzarzt, Medizinische Klinik, Spital Zimmerberg, Horgen	
2008 - 2009	Assistenzarzt, Chirurgische Klinik, Spital Zollikerberg	
2007	Staatsexamen	Zürich
2004	1. Teil Schlussprüfung	Zürich
2003	2. Propädeutikum	Fribourg
2001	1. Propädeutikum	Fribourg
1999	Beginn des Medizinstudiums	Fribourg
1993 – 1997	Kantonsschule (Typus B)	Trogen
1991 – 1993	Sekundarschule	Heiden
1986 – 1991	Primarschule	Heiden